

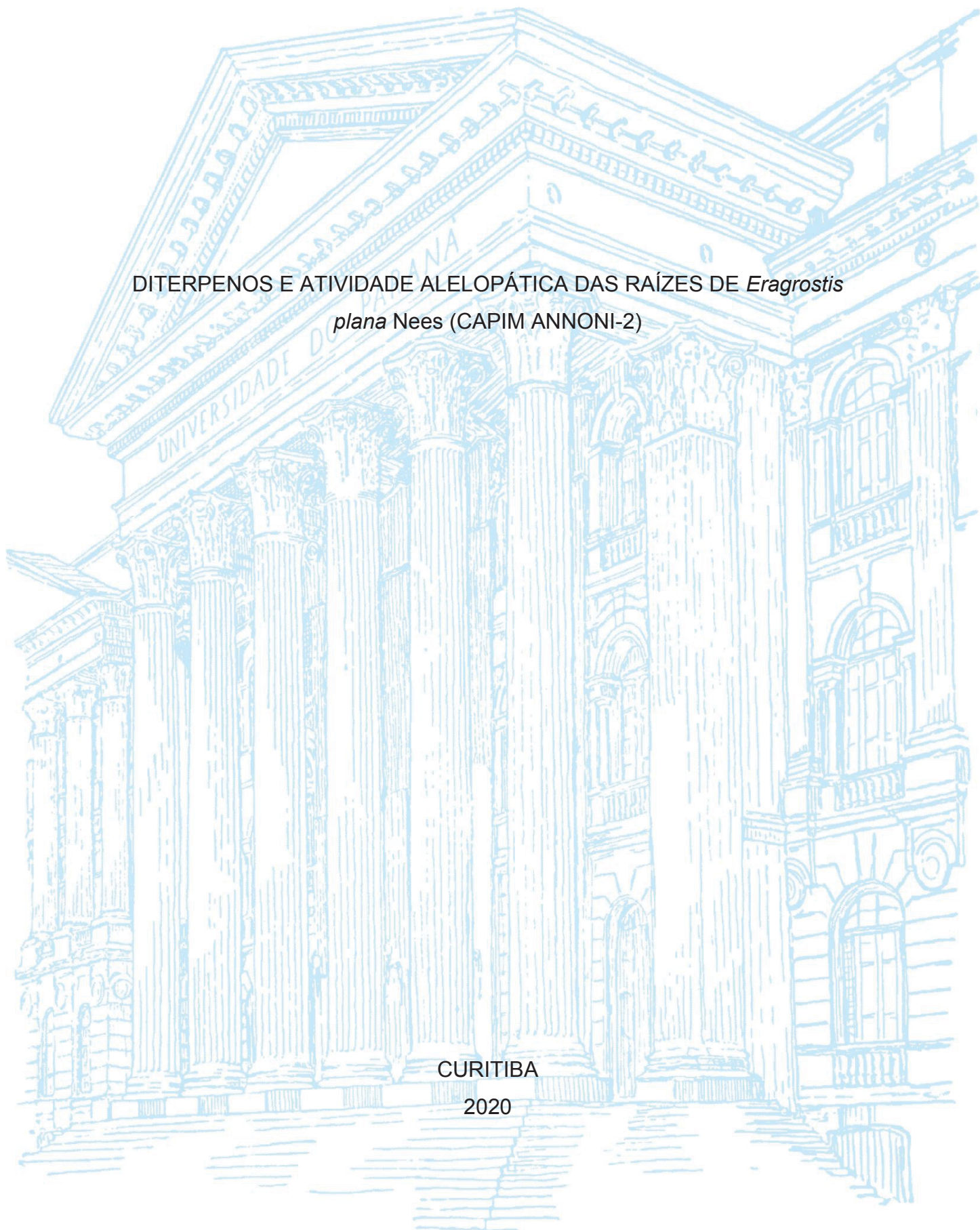
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA PALARO KLEIN HENDGES

DITERPENOS E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DAS RAÍZES DE *Eragrostis*
plana Nees (CAPIM ANNONI-2)

CURITIBA

2020



ANA PAULA PALARO KLEIN HENDGES

DITERPENOS E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DAS RAÍZES DE *Eragrostis*
plana Nees (CAPIM ANNONI-2)

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química; Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena L. de N. Sales Maia

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Sirlei Dias Teixeira

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

H497d

Hendges, Ana Paula Palaro Klein

Diterpenos e atividade alelopática das raízes de *Eragrostis plana* nees (Capimannoni-2) [recurso eletrônico] / Ana Paula Palaro Klein Hendges. – Curitiba, 2020.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

Orientador: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia –
Coorientador: Sirlei Dias Teixeira

1. Química vegetal. 2. Fitotoxinas. 3. Agentes alelopáticos. 4. Agentes antimicrobianos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. III. Teixeira, Sirlei Dias. IV. Título.

CDD: 547.7

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA PAULA PALARO KLEIN HENDGES** intitulada: **Diterpenos e Atividade Alelopática das Raízes de *Eragrostis plana* Nees (Capim Annoni-2)**, sob orientação da Profa. Dra. BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Agosto de 2020.

BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA
Presidente da Banca Examinadora

IEDA MARIA BEGNINI
Avaliador Externo (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DE
BLUMENAU)

FRANCISCO DE ASSIS MARQUES
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ANA LUISA LACAVA LORDELLO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CICERO DESCHAMPS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ- DPTO
FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde e por sempre colocar em meu caminho pessoas especiais.

Ao meu marido por todo apoio e incentivo, pelos conselhos e por entender meus momentos de ausência durante esse período.

Aos meus pais, irmãs e familiares que sempre me incentivaram a continuar, mas principalmente a minha sobrinha Laura, que trouxe muita alegria para nossa família.

À minha orientadora, Profa. Dra. Beatriz H. L. de N. S. Maia pela oportunidade, pelo apoio constante, ensinamentos prestados, rigor científico e amizade.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Sirlei D. Teixeira pelos ensinamentos prestados desde a graduação, pela atenção, disponibilidade e amizade.

Aos membros da banca, por aceitarem avaliar esse trabalho.

Aos professores da UTFPR, Vanderlei A. de Lima pela ajuda com as análises estatísticas e Michelangelo M. Trezzi pela ajuda com os testes alelopáticos.

Aos colegas e amigos do LAPNEQ, por toda ajuda durante esse período, pelas conversas, risadas e pela companhia.

Aos amigos da pensão Jardim das américas, em especial a Vanessa, Mônica, Mateus, Mario, Daniela e Diego, pela companhia durante os finais de semana, as conversas e todo o incentivo.

Ao programa de pós-graduação em Química da UFPR, pela estrutura e oportunidade.

À Universidade Federal do Paraná, pela estrutura.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram para realização deste trabalho.

“...the organic chemist walks in an untidy jungle of uncouthly named extractives,
rainbow display of pigments where in every bush there lurks the mangled shape of
some alkaloid, the exotic perfume of some new terpene, or some shocking and
explosive polyacetylene.”

Bu'Lock (1961)

RESUMO

Eragrostis plana (Nees) é uma planta daninha capaz de competir e dominar sobre outras espécies, fenômeno conhecido como alelopatia. Essa interação química entre plantas ocorre devido a produção e liberação no ambiente de compostos do metabolismo secundário, o que torna essas substâncias atrativas para as pesquisas de novos bio-herbicidas. Foram obtidos extratos de raízes de *E. plana* coletadas nas quatro estações do ano, utilizando solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, acetato de etila e metanol). Realizou-se, então, fracionamento bio guiado dos extratos brutos obtidos, seguido do isolamento e identificação das substâncias presentes nos mesmos. Os dados dos bioensaios foram analisados por MLG e PCA, essas análises mostraram que os extratos em éter de petróleo de raízes coletadas no inverno e no verão apresentaram maior efeito fitotóxico sobre a germinação e o crescimento de *Ipomoea grandifolia*. Foram isolados 10 diterpenos do tipo neocassano dos extratos brutos de *E. plana*, inéditos na literatura, identificados por técnicas espectrométricas e espectroscópicas. Os experimentos de DRX do neocassa-12(13),15-dien-14-ona (**1**) e do neocassa-12(13),15-dieno-3,14-diona (**2**) confirmaram um esqueleto do tipo neocassano e possibilitaram a definição da configuração relativa dos estereocentros da molécula. A definição da configuração absoluta dos estereocentros de neocassa-12(13),15-dieno-3,14-diona (**2**) e neocassa-12(17),15-dien-3-ona (**7**) foi realizada por VCD e definida como sendo 5*R*,8*R*,9*S*,10*R* e 5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*, respectivamente. Os testes fitotóxicos com as substâncias **2**, **9** e **10** mostraram que o 3-hidroxineocassa-12(17),15-dieno (**10**) provocou redução no comprimento da parte aérea e no comprimento da radícula de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*, respectivamente. Enquanto o neocassa-12(13),15-dieno-3,14-diona (**2**) reduziu o índice de velocidade de germinação das espécies receptoras, resultando no menor valor dessa variável quando comparado com o herbicida glifosato.

Palavras-Chave: Atividade Fitotóxica, Atividade Antimicrobiana, Neocassano, Dicroísmo Circular Vibracional.

ABSTRACT

Eragrostis plana (Nees) is a weed capable of competing and dominating over other species, a phenomenon known as allelopathy. This chemical interaction between plants occurs due to the production and release of secondary metabolism compounds into the environment, which makes these substances attractive for research on new bio-herbicides. Extracts of *E. plana* roots collected during each season throughout the year were obtained using solvents of different polarities (petroleum ether, ethyl acetate and methanol). Then, bioassay-guided fractionation of the crude extracts was carried out, followed by the isolation and identification of the substances present in them. The data from the bioassays were analyzed by MLG and PCA, these analyzes showed that extracts in petroleum ether from roots collected in winter and summer had greater phytotoxic effect on the germination and growth of *Ipomoea grandifolia*. Ten neocassane diterpenes were isolated from the crude extracts of *E. plana*, unpublished in the literature, identified by spectrometric and spectroscopic techniques. The DRX experiments of neocassa-12(13),15-dien-14-one (**1**) and neocassa-12(13),15-diene-3,14-dione (**2**) confirmed neocassane-type skeleton and made it possible to define the relative configuration of the molecule's stereocenters. The absolute configuration of the stereocenters of neocassa-12(13),15-diene-3,14-dione (**2**) and neocassa-12(17),15-dien-3-one (**7**) was defined by VCD as 5*R*,8*R*,9*S*,10*R* and 5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*, respectively. Phytotoxic tests with compounds **2**, **9** and **10** showed that 3-hydroxyneocassa-12(17),15-diene (**10**) caused reduction of the shoot length and of the radicle length of *Euphorbia heterophylla* and *Ipomoea grandifolia*, respectively. While neocassa-12(13),15-diene-3,14-dione (**2**) caused more reduction in the germination speed index than herbicide glyphosate.

Keywords: Phytotoxic Activity, Antimicrobial Activity, Neocassane, Vibrational Circular Dichroism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>E. plana</i> coletado na fazenda Pacheco no Município de Abelardo Luz-SC (esquerda) e ampliação das raízes (direita)	18
Figura 2 - Diterpenos com esqueleto cassano, isopimarano, labdano e norlabdano isolados no gênero <i>Eragrostis</i>	20
Figura 3 - Diterpenos com esqueleto neocassano isolados das raízes de <i>Eragrostis plana</i>	21
Figura 4 - Biossíntese de Terpenos	22
Figura 5 - Principais ações dos terpenos voláteis (setas azuis) e não voláteis (setas vermelhas) nas plantas	23
Figura 6 - Formação do difosfato de geranil geranila precursor dos diterpenos	24
Figura 7 - Ciclização do GGPP para formar o difosfato de copalila e o difosfato de labdadienila	24
Figura 8 - Via biossintética dos diterpenos do tipo cassadieno	25
Figura 9 - Esqueleto tipo cassano (esquerda) e tipo neocassano (direita).....	25
Figura 10 – Planta e sementes de <i>Ipomoea grandifolia</i>	29
Figura 11 - Plântula de <i>Ipomoea grandifolia</i> ; exemplo do que foi considerado como parte aérea e como radícula	30
Figura 12 - Planta e sementes de <i>Euphorbia heterophylla</i>	31
Figura 13 - Interação Estação vs. Solvente para a Variável Comprimento da Parte Aérea (CPA)	43
Figura 14 - Interação Solvente vs. Tratamento para a Variável Comprimento da Parte Aérea (CPA).....	44
Figura 15 - Interação Espécie vs. Solvente para a Variável Comprimento da Radícula (CR). ..	45
Figura 16 - Interação Estação vs. Solvente para a Variável Porcentagem de Germinação (PG).	47
Figura 17 - IVG e TMG de <i>I. grandifolia</i> em Função da Estação. Letras Diferentes Significam que as Médias são Diferentes com 95% de Significância	48
Figura 18 - PCA dos Testes Alelopáticos dos Extratos Brutos de Raízes de <i>E. plana</i> , Coletadas nas Quatro Estações do Ano, Obtidos com Solventes de Diferentes Polaridades (Éter de Petróleo, Acetato de Etila e Metanol) e Testados em 5 Concentrações Diferentes (100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm e 500ppm) – Gráfico de Scores e de Loadings.	49
Figura 19 - Cromatogramas dos Extratos Brutos Obtidos das Raízes de <i>E. plana</i> Coletadas nas Quatro Estações do Ano e Utilizando Diferentes Solventes: Éter de Petróleo (EP), Acetato de Etila (AE) e Metanol (M).	52
Figura 20 - Cromatograma da Substância 2	53
Figura 21 - PCA dos Cromatogramas dos Extratos Brutos de <i>E. plana</i> Obtidos com Diferentes Solventes de Raízes Coletadas nas Quatro Estações do Ano. EP = Éter de Petróleo, AE = Acetato de Etila e M = Metanol.	54
Figura 22 - Gráfico de loadings – PC1 (esquerda) e PC2 (direita)	55
Figura 23 – Substâncias 1-6 Isoladas dos Extratos Brutos de <i>E. plana</i>	56
Figura 24 – Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância 1	59
Figura 25 – Representação ORTEP da Substância 1	59
Figura 26 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas), COSY (linhas grossas) (esquerda) e NOE (direita) para a Substância 2	62
Figura 27 - Diterpeno neocassano já isolado das raízes de <i>E. plana</i> com insaturação em C-1	62
Figura 28 - Estruturas e Deslocamentos Químicos de ¹³ C de Diterpenos cassano (esquerda, já relatado na literatura) e neocassano (direita, apresentado neste trabalho) isolados do gênero <i>Eragrostis</i>	63
Figura 29 - Representação ORTEP da Substância 2	63
Figura 30 - Espectros de VCD e IR Experimentais e Calculados da Substância 2	64

Figura 31 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância 3	65
Figura 32 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância 4	67
Figura 33 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância 5	69
Figura 34 – Estruturas e Deslocamentos Químicos de ^{13}C de Isopimaranos com Hidroxilas nas Posições C-2 ou C-3 Isolados de <i>Pulicaria wightiana</i>	69
Figura 35 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância 6	71
Figura 36 – Estrutura e Deslocamentos Químicos de ^{13}C do Fitocassano D isolado de <i>Oryza sativa</i> L.	71
Figura 37 - Substâncias 7-10 Isoladas dos Extratos Brutos de <i>E. plana</i>	72
Figura 38 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas), COSY (linhas grossas) (esquerda) e NOE (direita) para a Substância 7	74
Figura 39 - Espectros de VCD e IR Experimentais e Calculados da Substância 7	75
Figura 40 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância 8	77
Figura 41 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas), COSY (linhas grossas) (esquerda) e NOE (direita) para a Substância 9	79
Figura 42 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas), COSY (linhas grossas) (esquerda) e NOE (direita) para a Substância 10	81
Figura 43 – Estrutura e Deslocamentos Químicos de ^{13}C de Diterpeno Cleistanano Isolado do Caule de <i>Croton oblongifolius</i>	81
Figura 44 – Estrutura Química das Substância Isoladas das Raízes de <i>E. plana</i> (2, 9 e 10) e do Herbicida Glifosato	84
Figura 45 - Interação Substância vs. Espécie Receptora para a Variável Comprimento da Parte Aérea (CPA)	84
Figura 46 - Plântula de <i>E. heterophylla</i> retirada da placa com a substância 10 (A) e da placa controle (B)	85
Figura 47 - Interação Substância vs. Concentração para a Variável Comprimento da Parte Aérea (CPA)	86
Figura 48 - Interação Substância vs. Espécie Receptora para a Variável Comprimento da Radícula (CR).....	87
Figura 49 - Plântulas de <i>I. grandifolia</i> Retiradas da Placa com a Substância 10 e Ampliação de Radículas com Necrose e Deformidades (A) e Plântulas da placa Controle (B).....	87
Figura 50 - Interação Substância vs. Concentração para a Variável Comprimento da Radícula (CR)	88
Figura 51 – Índice de Velocidade de Germinação em função da Substância testada	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frações Resultantes da Cromatografia em Coluna dos Extratos Brutos em Éter de Petróleo Primavera, Verão e Outono	36
Tabela 2 - Frações Resultantes da Cromatografia em Coluna da Fração F36 do Extrato das Raízes em Éter de Petróleo Outono	38
Tabela 3 - Frações Resultantes da Cromatografia em Coluna do Extrato Bruto em Acetato de Etila das raízes Verão	39
Tabela 4 - Massa dos Extratos das Raízes de <i>E. plana</i> Coletadas nas Quatro Estações do Ano/2016/2017	41
Tabela 5 - Fatores que Resultaram em Diferenças Estatísticas Significativas para as Variáveis Dependentes de Crescimento (CR e CPA) e de Germinação (PG, IVG e TMG) da Espécie Receptora <i>I. grandifolia</i>	42
Tabela 6 - Atividades antimicrobianas (CIM - concentração inibitória mínima) dos extratos brutos de <i>E. plana</i> – Entre parênteses CBM (Concentração bactericida mínima)	51
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 1 em CDCl_3	58
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 2 em CDCl_3 e comparação com a literatura	61
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 3 em CDCl_3	65
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 4 em CDCl_3	66
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 5 em CDCl_3	68
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 6 em CDCl_3	70
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 7 em CDCl_3	73
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 8 em CDCl_3	76
Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 9 em CDCl_3	78
Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância 10 em CDCl_3	80
Tabela 17 - Fatores que Resultaram em Diferenças Estatísticas Significativas para as Variáveis Dependentes de Crescimento (CR e CPA) e de Germinação (IVG)	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ϵ - Absortividade molar

$[\alpha]^{20}_D$ - Rotação específica a 20 °C

AcOEt - Acetato de Etila

AIC - *Akaike Information Criterion*

ATCC - *American Type Culture Collection*

ax - Axial

br - *broad*

CC - Cromatografia em coluna

CCT - Fundação André Tosseto

CCDA - Cromatografia em camada delgada analítica

CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa

$CDCl_3$ - Clorofórmio deuterado

$CHCl_3$ - Clorofórmio

CIM - Concentração inibitória mínima

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

COSY - *Homonuclear correlation spectroscopy*

CPA - Comprimento da parte aérea

CR - Comprimento da radícula

DCM - Diclorometano

DRX - Difractometria de raios X

δ - Deslocamento químico

d - duplete

dd - duplo duplete

ddd - duplo duplo duplete

dq - duplo quarteto

dt - duplo tripleto

EE - Éter Etílico

EP - Éter de Petróleo

Eq - equatorial

GGPP - Difosfato de geranil geranila

HEX - Hexano

HMBC - *Heteronuclear multiple bond coherence*

HPLC - *High performance liquid chromatography*

HRESIMS - *High resolution electrospray ionisation mass spectrometry*

HSQC - *Heteronuclear single quantum coherence*

IR - Infravermelho

IVG - Índice de velocidade de germinação

m - multipletto

m/z - Relação massa/carga

NOE - Efeito nuclear *overhauser*

MBC - Concentrações bactericidas mínimas

MBF - Concentrações fungicidas mínimas

MeOH - Metanol

MLG - Modelo linear generalizado

PC - *Principal Component*

PCA - *Principal Component Analysis*

PG - Porcentagem de germinação

qd - quarteto de dupletto

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

s - simpleto

t - tripleto

TMG - Tempo médio de germinação

TTC - Cloreto de trifenil tetrazólio

UV-vis - Região de comprimento de onda no ultravioleta e visível

VCD - *Vibrational circular dichroism*

λ_{\max} - Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ALELOPATIA – A BUSCA POR HERBICIDAS NATURAIS	15
1.2 <i>Eragrostis plana</i> Nees	18
1.3 TERPENOS: UM POUCO DE BIOSÍNTESE E AÇÃO NAS PLANTAS	21
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 METODOLOGIA	26
3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS	26
3.2 MATERIAL VEGETAL	28
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS RAÍZES	28
3.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS BRUTOS	28
3.4.1 Teste do Potencial Osmótico Pelo Método De Schardakow	29
3.4.2 Espécie Receptora	29
3.4.3 Bioensaio de Germinação de Sementes	29
3.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DAS SUBSTÂNCIAS 2, 9 e 10	30
3.6 ANÁLISE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS	31
3.7 PREPARO DE AMOSTRA E CONDIÇÕES DE ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	32
3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3.9 DICROISMO CIRCULAR VIBRACIONAL	33
3.10 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X	34
3.11 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS	34
3.11.1 Dados Espectroscópicos e Espectrométricos das Substâncias 1, 2, 7, 9 e 10	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 TESTES ALELOPÁTICOS COM OS EXTRATOS BRUTOS	41
4.1.1 Efeito dos Extratos de Raízes de <i>Eragrostis plana</i> Sobre o Crescimento de <i>Ipomoea grandifolia</i>	42
4.1.2 Efeito dos Extratos de Raízes de <i>Eragrostis plana</i> Sobre a Germinação de <i>Ipomoea grandifolia</i>	46
4.1.3 Análise de Componentes Principais dos Dados Obtidos nos Testes Alelopáticos com os Extratos Brutos	49
4.2 ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS	50
4.3 ANÁLISES DOS EXTRATOS BRUTOS E DA SUBSTÂNCIA 2 POR CLAE	52
4.3.1 Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis - PCA) dos Extratos Brutos Analisados por CLAE	54
4.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	56
4.4.1 Determinação Estrutural Das Substâncias 1-6	56
4.4.2 Determinação Estrutural Das Substâncias 7-10	72
4.5 TESTES ALELOPÁTICOS COM AS SUBSTÂNCIAS PURAS	82
5.0 CONCLUSÃO	90
6.0 REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	99

1 INTRODUÇÃO

A rica diversidade estrutural e de grupos funcionais presentes nas substâncias isoladas de espécies brasileiras, vem ganhando destaque desde 1533 com a descoberta do pau-Brasil, do qual era extraído o corante vermelho brasilina muito valioso. Acredita-se que essa diversidade é resultado do modo de vida fixo das plantas, afinal, elas não podem escapar de predadores nem das adversidades do meio ambiente, como fazem os animais, necessitando de comunicação química para garantir sua sobrevivência (TISSIER, ZIEGLER, VOGT, 2015).

Atualmente, embora os produtos naturais sejam utilizados pelo homem para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos, fragrâncias e outros bioprodutos, ainda são poucas as inovações nesse campo, levando-se em conta a rica biodiversidade do país (BOLZANI, 2016; DUTRA et al., 2016). Essas aplicações são possíveis pelo fato de as espécies possuírem capacidade de sintetizar metabólitos (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; PEREIRA; CARDOSO, 2012), os quais podem ser divididos em duas grandes categorias, primários e secundários (HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2011; LEE et al., 2013).

Os metabólitos primários são essenciais para a vida e estão presentes em todos os organismos vivos, já os metabólitos secundários, ou especializados, são substâncias que têm como matéria-prima, compostos originados do metabolismo primário e, normalmente, são específicos de cada espécie ou gênero (LARCHER, 2000; TISSIER, ZIEGLER, VOGT, 2015).

Os metabólitos secundários apresentam diversas aplicações em muitas áreas, isso se deve ao fato de atuarem por exemplo, como agentes antibacterianos ou antifúngicos, agentes redutores do colesterol, imunossupressores, antiparasitários e herbicidas (VAISHNAV; DEMAINE, 2010). No caso específico de plantas, auxiliam no processo de polinização, produzindo substâncias que atraem os agentes vivos, além de contribuírem para a resistência dos organismos, na defesa contra pestes e outras doenças (FILHO, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2013).

1.1 ALELOPATIA – A BUSCA POR HERBICIDAS NATURAIS

Plantas daninhas são espécies indesejáveis que interferem de forma negativa aos interesses do homem, além disso, são extremamente agressivas, pois são capazes de produzir uma grande quantidade de sementes, são pouco exigentes quanto as condições fisiológicas, possuem a capacidade de germinar e emergir de grandes profundidades, apresentam facilidade de dispersão para grandes distâncias,

além de rápido desenvolvimento e crescimento. Essas características contribuem para a grande competição entre plantas daninhas e plantas cujo cultivo é de interesse do homem (CONSTANTIN; OLIVEIRA, 2001; SILVA; SILVA, 2007; SILVA; COELHO; MEDEIROS, 2008).

Essa competição gerada pelas plantas daninhas causa redução significativa na produção agrícola, aumenta os custos de produção, dificulta a operação de colheita e interfere na qualidade do produto (CONSTANTIN; OLIVEIRA, 2001; LIMA et al., 2011). Sendo assim, o controle de plantas daninhas é imprescindível para garantir aumento de rendimento em qualquer exploração agrícola, tornando-se dessa forma, indispensável para o sucesso da produtividade no campo (RIOS et al., 2010; VATS, 2015).

O controle químico de plantas daninhas iniciou-se em 1947 após a descoberta do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um regulador de crescimento encontrado no coleótilo da aveia. Essa descoberta levou as indústrias a investirem em pesquisas buscando novas substâncias reguladoras do crescimento das plantas (VATS, 2015). A partir daí essas substâncias sintéticas passaram a se constituir no método mais fácil e acessível para o manejo de plantas daninhas e, conseqüentemente a dependência desses compostos tem aumentado nas últimas décadas, especialmente nos países denominados emergentes (ARANITI et al., 2019).

Contudo, o uso indiscriminado de herbicidas sintéticos vem ao longo dos anos tornando as espécies daninhas cada vez mais resistentes a tais compostos (AGOSTINETTO, 2009; KNEZEVIC; JHALA; GAINES, 2017), nota-se que, antes da introdução dos herbicidas, a evolução das características de resistência e tolerância dessas espécies era menos evidente. As plantas daninhas desenvolveram mecanismos para evitar, tolerar ou resistir a métodos de controle já conhecidos (POWLES; HOLTUM, 2018).

Atualmente são conhecidas 262 espécies (152 dicotiledôneas e 110 monocotiledôneas) de plantas daninhas resistentes a herbicidas em todo o mundo. Elas desenvolveram resistência a 23 dos 26 mecanismos de ação conhecidos de herbicidas e a 167 herbicidas diferentes. Espécies resistentes a herbicidas foram relatadas em 93 culturas distribuídas em 70 países (HEAP, 2020).

O principal mecanismo de resistência adotado pelas plantas daninhas é a modificação do sítio de atuação do herbicida, assim, a substância ativa é incapaz de exercer seu efeito fitotóxico, pois não pode mais se ligar ao sítio de ação (ZIMDAHL, 2018). Sempre que uma espécie se torna resistente a um determinado composto é necessário alterar o mecanismo de ação do herbicida. Isso era mais fácil antes de

1990, pois novos mecanismos de ação eram descobertos e lançados no mercado com muita frequência (DUKE, 2011; KNEZEVIC; JHALA; GAINES, 2017).

Contudo, nos dias atuais, reduziu-se o número de substâncias fitotóxicas introduzidas no mercado, o que vem dificultando o controle de espécies daninhas resistentes aos herbicidas tradicionais (DUKE, 2011; KNEZEVIC; JHALA; GAINES, 2017). Assim, o estudo e descoberta de novas substâncias com potencial ação herbicida, que apresentem novos mecanismos de ação, podem ser uma boa alternativa para contornar o problema de espécies resistentes (DUKE, 2011; HEAP, 2020).

As plantas daninhas podem liberar no ambiente, metabólitos secundários, que são capazes de influenciar nos processos metabólicos normais de outras plantas, incluindo respiração, divisão celular, crescimento, desenvolvimento, produtividade e atividade enzimática (CARMO; LIMA; TAKAKI, 2007; LI et al., 2011; DASTAN et al., 2014). Segundo Borella e Pastorini (2009), quando essa influência é negativa, as etapas mais afetadas são a germinação das sementes e o crescimento das plantas.

Esse fenômeno é conhecido como alelopatia e, envolve a interação química de plantas e microrganismos através da produção e liberação no ambiente de compostos provenientes do metabolismo secundário (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007; FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

No processo de alelopatia, vários metabólitos especializados estão envolvidos, os que mais se destacam são, alcaloides, flavonoides, terpenoides, cumarinas e saponinas (RODRIGUES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

Uma estratégia para isolar os metabólitos especializados produzidos pelas plantas é a realização de um fracionamento bioguiado, onde os tecidos ou exsudatos da espécie alelopática são extraídos com solventes apropriados, para fornecer extratos brutos com alto nível de atividade fitotóxica. Uma vez extraídos, esses extratos são testados e fracionados de acordo com a fitotoxicidade apresentada (MACIAS et al., 2001; DUCKE, 2015).

Infelizmente compostos oriundos de fontes naturais são, geralmente, obtidos em pequenas quantidades. Contudo, a rica diversidade estrutural dos compostos extraídos de plantas, pode culminar na descoberta de novos modos de ação e, considerando que o controle químico de plantas daninhas ainda é a prática agrônoma mais difundida, o desenvolvimento de novos bio-herbicidas torna-se economicamente importante (MACIAS et al., 2007; PEROTTI et al., 2020).

1.2 *Eragrostis plana* Nees

Uma espécie muito conhecida por seu potencial alelopático é o *Eragrostis plana* Nees, também chamada de Capim Annoni-2 (Figura 1), (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008, DALBOSCO, 2013; SILVA, 2014). Acredita-se que a interação alelopática tem garantido o domínio do *E. plana* sobre as demais plantas, pois prejudica a germinação de sementes de diversas espécies nativas e exóticas (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008), o que desperta interesse pelo estudo fitoquímico dessa espécie.

Figura 1 - *E. plana* coletado na fazenda Pacheco no Município de Abelardo Luz-SC (esquerda) e ampliação das raízes (direita)



Eragrostis plana é uma Poaceae sul-africana, perene, estival e exótica (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008), introduzida acidentalmente no Brasil em 1950. Possui atributos de planta invasora, e é responsável por prejuízos econômicos e

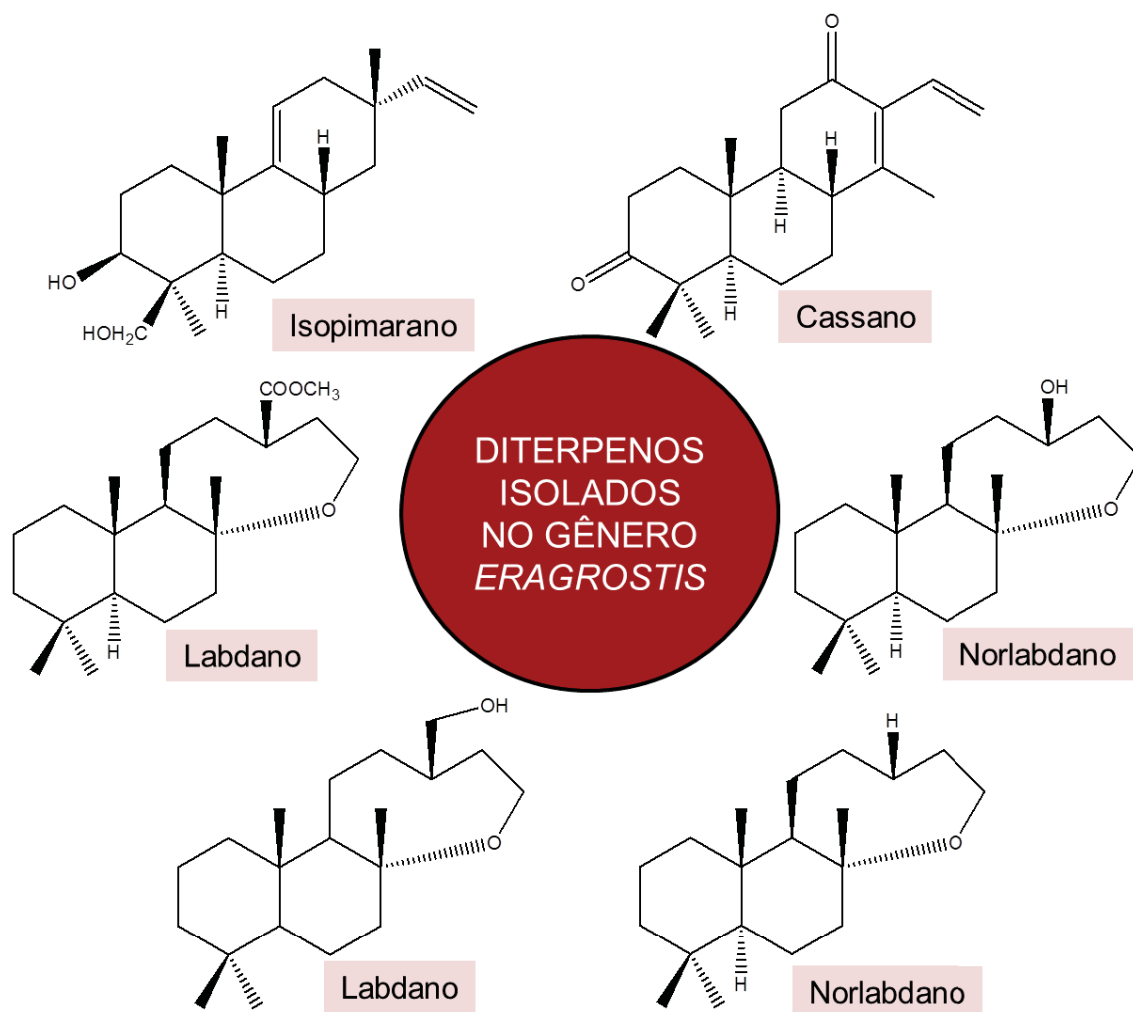
sociais nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo este último, o estado mais afetado por essa planta daninha (ZENNI; ZILLER, 2011).

A família Poaceae inclui uma infinidade de espécies forrageiras que apresentam um enorme poder de disseminação e de colonização, isso se deve ao fato dessas espécies serem perenes e de produzirem grande quantidade de sementes, mesmo quando as condições ambientais são desfavoráveis (SILVA; COELHO; MEDEIROS, 2008).

Eragrostis é um gênero com cerca de 350 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas de ambos os hemisférios, sendo o Brasil o país da América do Sul com o maior número de espécies desse gênero. São encontradas na maioria dos habitats, contudo a maior predominância ocorre em lugares abertos e solos secos (BOECHAT; LONGHI-WAGNER, 2000). Esse gênero, em geral, é conhecido pelo seu alto valor nutritivo, sendo usado como forragem para a alimentação de gado (SEBASTIÃO et al., 2010).

Do ponto de vista químico, pode-se destacar no gênero *Eragrostis*, a presença de diterpenos das classes cassano, isopimarano (NISHIYA et al., 1991), labdano e norlabdano (SEBASTIÃO et al., 2010; SEBASTIÃO et al., 2012) (Figura 2), e embora o modo de ação dessas substâncias ainda seja pouco conhecido, sabe-se que as pesquisas com diterpenos são promissoras para o desenvolvimento de novos bio-herbicidas (MACIAS et al., 2007; SOLTYS et al., 2013).

Figura 2 - Diterpenos com esqueleto cassano, isopimarano, labdano e norlabdano isolados no gênero *Eragrostis*



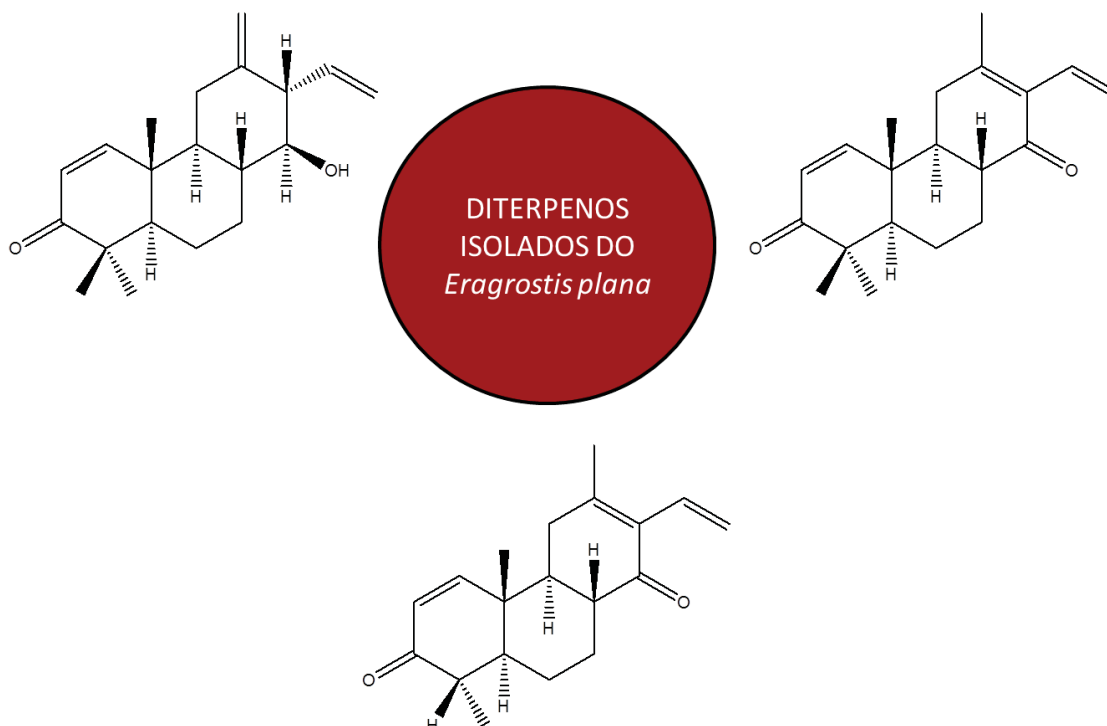
Eragrostis plana apresenta estudos do ponto de vista biológico e agrônomo, sendo encontrados na literatura poucos relatos sobre o estudo fitoquímico de metabólitos secundários dessa espécie (FAVARETTO et al., 2015; FIORENZA et al., 2016; FAVARETTO et al., 2019).

Favaretto et al. (2015), estudando a anatomia e a histoquímica do *E. plana* confirmaram a presença de alcaloides, ao longo dos feixes vasculares, nas folhas e raízes dessa espécie. Em outro estudo (HENDGES, 2015) um rotenoide e um triacilglicerol foram isolados das folhas de *E. plana*. Alguns rotenoides foram identificados em espécies que apresentam ação herbicida, o que sugere que esta classe de compostos químicos possa estar relacionada com o potencial alelopático de *E. plana* (HENDGES, 2015), sendo de grande interesse a realização de testes alelopáticos com essa substância pura.

Estudo recente, com as raízes de *E. plana* revelou a presença de uma nova classe de diterpenos, os de esqueleto tipo neocassano. Foram isolados três diterpenos

pertencentes a essa classe (Figura 3), que em testes alelopáticos realizados, foram capazes de inibir o crescimento da lentilha-d'água (FAVARETTO et al., 2019).

Figura 3 - Diterpenos com esqueleto neocassano isolados das raízes de *Eragrostis plana*



Considera-se, portanto, o nosso estudo apresentado aqui como sendo de extrema importância, uma vez que extratos brutos de *E. plana* em diferentes polaridades, das folhas e das raízes apresentaram atividade alelopática em estudos preliminares (DALBOSCO, 2013; SILVA, 2014).

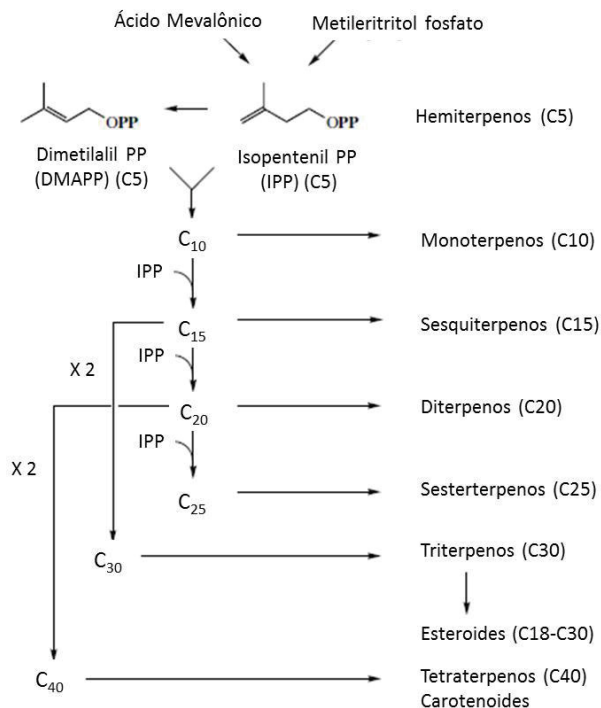
Dessa forma, levando em conta os resultados promissores já relatados, tornou-se de grande relevância, principalmente por apresentar perspectivas de resultados positivos, a verificação das propriedades alelopáticas de componentes puros, extraídos dessa espécie. Se confirmadas essas propriedades, seria possível vislumbrar a geração de novo bio-herbicida, ou mesmo um “modelo” para a síntese de uma molécula com propriedades herbicidas, ou ainda viabilizar e sustentar estudos futuros de novos mecanismos de ação de herbicidas.

1.3 TERPENOS: UM POUCO DE BIOSÍNTESE E AÇÃO NAS PLANTAS

Os terpenos, ou terpenoides, constituem a maior classe de metabólitos secundários conhecidos, eles podem ser biossintetizados por duas rotas, a do ácido

mevalônico e a do fosfato de metileritritol (MEP) (Figura 4) (DEWICK, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2013; TISSIER; ZIEGLER; VOGT, 2015).

Figura 4 - Biossíntese de Terpenos

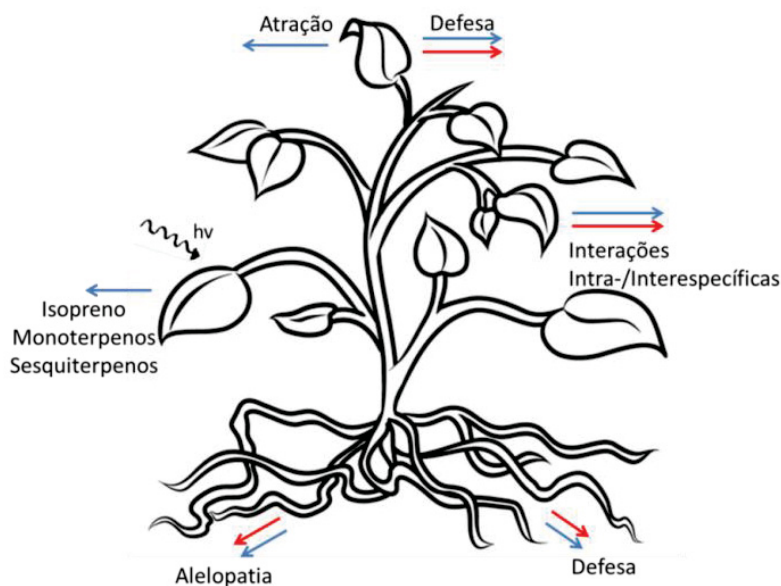


Fonte: Adaptado de Dewick (2002)

Eles são classificados de acordo com o número de unidades de 5 átomos de carbono (C5) que possuem. Os monoterpenos, possuem duas unidades de C5, portanto, dez átomos de carbono; os sesquiterpenos, três unidades, os diterpenos, quatro unidades, como mostra a figura 4 (DEWICK, 2002).

Os terpenos de baixa massa molecular, voláteis ou semi-voláteis, que incluem hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, são responsáveis pela proteção das plantas contra o estresse abiótico e em várias interações bióticas acima e abaixo do solo. Hemiterpenos e monoterpenos, por exemplo, podem estar associados à proteção contra o estresse térmico (Figura 5) (THOLL, 2014).

Figura 5 - Principais ações dos terpenos voláteis (setas azuis) e não voláteis (setas vermelhas) nas plantas



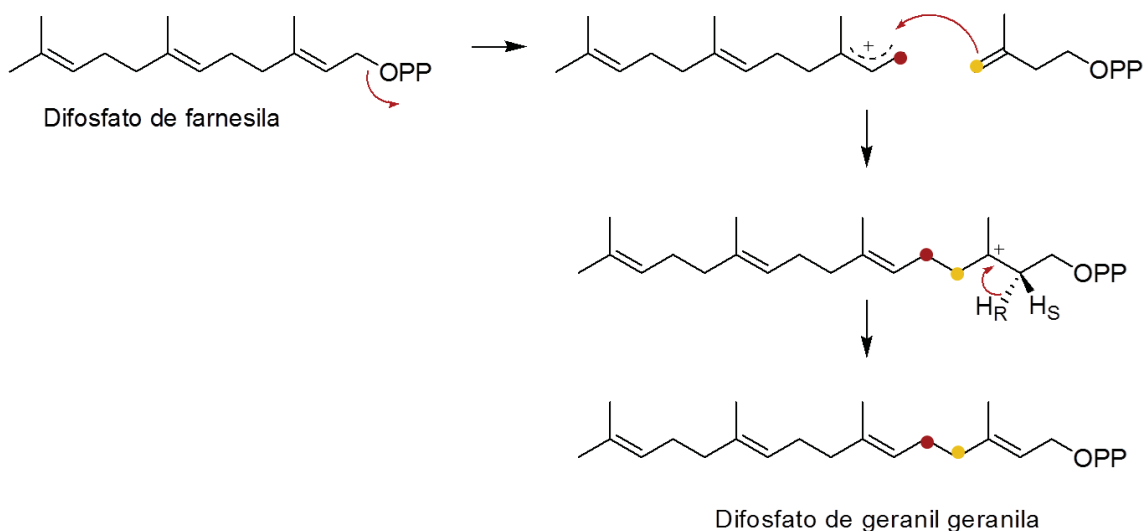
Fonte: Adaptado de Tholl (2014).

Alguns terpenos voláteis podem ser responsáveis pelas interações intra-/interespecíficas das plantas, induzindo respostas de defesa nas espécies vizinhas ou em tecidos não atacados da mesma planta. Nessas interações, os voláteis não precisam necessariamente entrar no tecido foliar da planta vizinha, mas permanecer na superfície da folha (THOLL, 2014).

As funções dos terpenos voláteis na defesa da planta são complementadas pela ação dos terpenos não voláteis. Esses podem ser exsudados das raízes para a rizosfera e ambiente circundante do solo, e estão envolvidos em diferentes respostas de defesa, como é o caso de alguns diterpenos que possuem ação comprovada nos mecanismos de defesa das plantas (SCHMELZ et al., 2011; XU et al., 2011; THOLL, 2014).

Na literatura é possível encontrar relatos da ação fitotóxica de um grande número de diterpenos, confirmando que eles desempenham um papel importante nas interações da planta (WEI et al., 2019). Os diterpenos, derivados de quatro unidades de C₅, são uma classe de produtos naturais estruturalmente diversa (Figura 6).

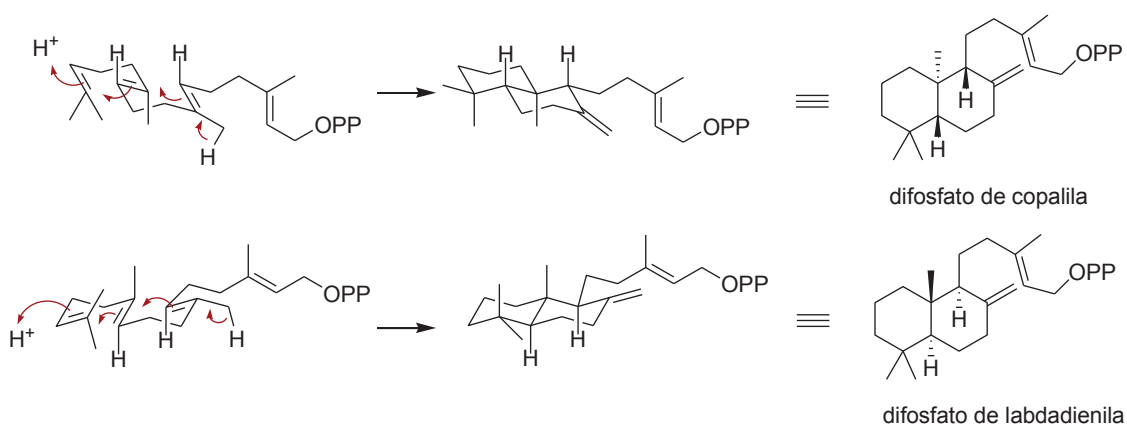
Figura 6 - Formação do difosfato de geranil geranila precursor dos diterpenos



Fonte: Adaptado de Dewick (2002).

A protonação do difosfato de geranil geranila (GGPP) pode iniciar uma ciclização concertada que termina com a perda de um próton de grupo metila. A figura abaixo mostra duas conformações cadeira diferentes para o GGPP, a primeira dá origem ao difosfato de copalila e a segunda ao difosfato de labdadienila (Figura 7), que, por sua vez, representa a estereoquímica de maior ocorrência na natureza (DEWICK, 2002).

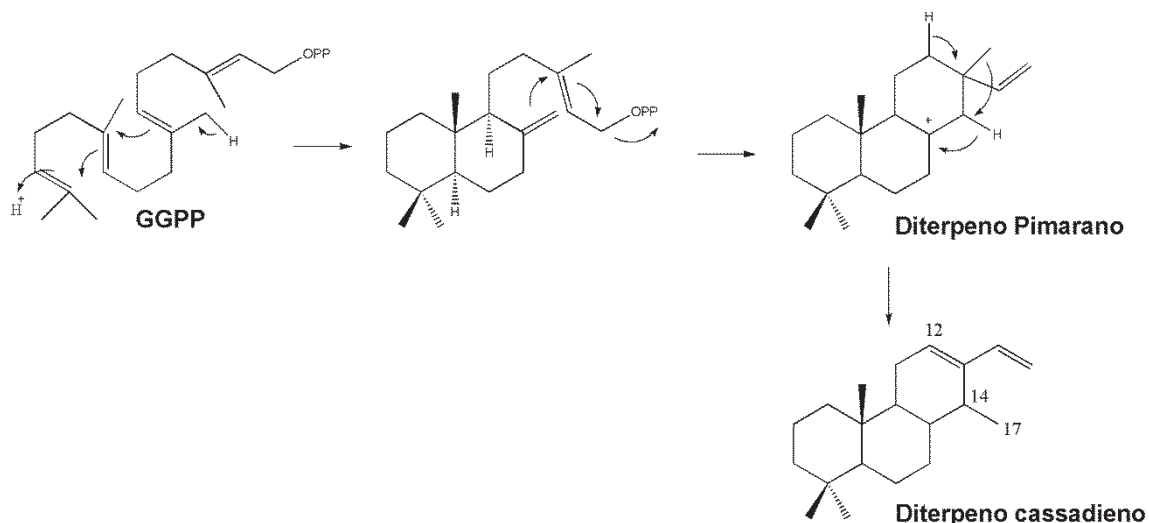
Figura 7 - Ciclização do GGPP para formar o difosfato de copalila e o difosfato de labdadienila



Fonte: Dewick (2002).

Reações de ciclização via carbocátions, e rearranjos do GGPP mediados por enzimas, podem levar às mais variadas estruturas diterpênicas (BARBOSA, VEGA, 2017), como exemplo, pode-se apresentar o esqueleto do tipo cassadieno (Figura 8).

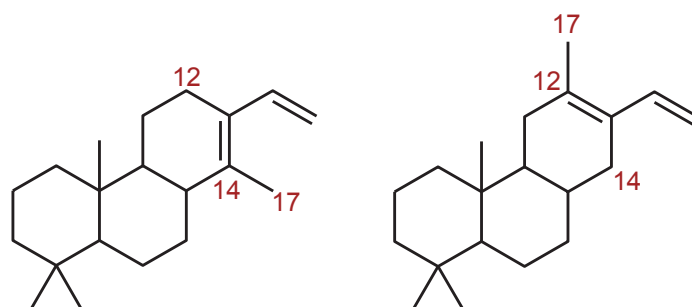
Figura 8 - Via biossintética dos diterpenos do tipo cassadieno



Fonte: Adaptado de Dewick (2000) e Bai et al. (2017)

Diterpenos com estrutura química muito semelhante à dos cassanos, foram isolados das raízes de *E. plana*, cuja principal diferença dessa nova classe de diterpenos está na posição do grupo metila (CH_3 -17). Nos cassanos esse grupo é posicionado no carbono C-14, enquanto no novo esqueleto (neocassanos) este grupo está ligado ao carbono C-12 (FAVARETTO et al., 2019) (Figura 9).

Figura 9 - Esqueleto tipo cassano (esquerda) e tipo neocassano (direita)



Fonte: Autor

Desta forma, os compostos do metabolismo secundário são atrativos para as pesquisas de novos herbicidas, devido, a grande variabilidade de estruturas químicas existentes, além de serem, teoricamente, mais seguros ao ambiente (TUR; BORRELA; PASTORINI, 2010), visto que, herbicidas naturais apresentam ação mais específica (BORELLA; PASTORINI, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial alelopático das raízes de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) visando uma futura aplicação como bio-herbicida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar o potencial alelopático dos extratos brutos obtidos com solventes em ordem crescente de polaridade (éter de petróleo, acetato de etila e metanol) de raízes coletadas nas diferentes estações do ano (primavera, verão, outono e inverno);
- Realizar o fracionamento e isolamento dos metabólitos secundários dos extratos que apresentarem melhor potencial alelopático;
- Realizar a identificação dos metabólitos isolados, por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- Testar o potencial alelopático das substâncias isoladas dos extratos (desde que obtidas em quantidade suficiente para a realização dos testes alelopáticos).

3 METODOLOGIA

3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

As análises de rotação específica foram realizadas em um polarímetro JASCO P-2000, utilizando cela de 10 dm. Para as análises de UV-vis utilizou-se espectrofotômetro Shimadzu UV-2401PC, cubetas de quartzo de 1 mm e analisou-se no intervalo de comprimento de onda de 190 a 800 nm. As análises no infravermelho foram realizadas em espectrofotômetro Vertex 70, tendo sido utilizada janela de ZnSe, resolução espectral de 4 cm⁻¹ e uma média de 16 scans. Todas essas análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D foram obtidas no Centro de RMN da UFPR, registradas em Espectrômetro de RMN Bruker DPX 200, Avance 400 e/ou Avance III 600 (Bruker), operando a 4,7, 9,4 e 14,1 Tesla, respectivamente e observando os núcleos de ¹H a 200, 400 e 600 MHz e a 50, 100 e 150 MHz para ¹³C. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃)

(Aldrich, 99,8%). Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ) e referenciados em relação ao TMS (tetrametilsilano) (0,00 ppm).

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas no Instituto de Química da USP, utilizando espectrômetro de massas Bruker micrOTOF-QII (Bruker, Billerica, MA, USA) em modo positivo de ionização, sob supervisão da Dra Lydia Fumiko Yamaguchi.

Para análise por CLAE foi utilizado o equipamento Waters, equipado com duas bombas modelo 600E, injetor automático 717 plus e detector de arranjo de fotodiodos modelo 2998. Os dados foram coletados utilizando o software Empower 2. Metanol grau espectroscópico (SK Chemicals, Korea) e água ultrapura, obtida em equipamento Purelab Classic, foram usados. Essa análise foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Nas separações por cromatografia em coluna (CC) foi utilizada sílica gel 60 (0,063-0,2 mm; Macherey-Nagel, Germany e 0,040-0,063 mm; Merck, Germany) como fase estacionária. Nas análises por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio, TLC, recobertas por sílica gel 60 com indicador de fluorescência F254 e 0,2 mm de espessura (Merck). As placas utilizadas nas separações em Camada Delgada Preparativa (CCDP) foram preparadas no laboratório utilizando placas de vidro 20x20 cm recobertas com sílica gel 60 com indicador de fluorescência HF254 (0,5-40 μ m; Merck, Germany) e espessura de 1 mm. As placas foram reveladas com luz UV (254 e 366 nm) e solução de anisaldeído. As frações foram selecionadas para purificação considerando o perfil em CCDA e o espectro de RMN de ^1H (200 MHz).

As estruturas cristalinas das substâncias **1** e **2** foram determinadas por Difractometria de Raios X de monocristal (DRX). Os dados foram obtidos através de um difratômetro modelo Bruker D8 Ventura, equipado com detector de área Photon 100 e uma fonte de Mo-K α e monocromador de grafite (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany), as análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR pela Mrs. Francielli S. Santana.

As análises antimicrobianas foram realizadas na Divisão de Microbiologia (CPQBA-UNICAMP) em colaboração com a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte. Para os ensaios, foram utilizados cloranfenicol (Sigma-Aldrich), nistatina (Merck) e TTC (Merck).

A configuração absoluta das substâncias **2** e **7** foi determinada em espectrômetro de dicroísmo circular vibracional com transformada de Fourier (FT-VCD) marca BioTools modelo ChiralIR-2X, controlado por software de mesmo nome, equipado com um modulador fotoelástico de ZnSe otimizado em 1400 cm^{-1} , e operado

com resolução de 4 cm^{-1} . Esse instrumento encontra-se instalado no Instituto de Ciência e Tecnologia da UNIFESP, em São José dos Campos, a análise foi supervisionada pelo Prof. Dr. João Marcos Batista Junior. O instrumento permite aquisição simultânea dos espectros no infravermelho (IR) e de VCD.

3.2 MATERIAL VEGETAL

Amostras de raízes de *E. plana* foram coletadas nos dias 22/11/2016 (primavera), 18/02/2017 (verão), 10/06/2017 (outono) e 15/09/2017 (inverno), em área pertencente à Fazenda Pacheco, no município de Abelardo Luz, estado de Santa Catarina, Brasil (-26.527820, -52.255808 e altitude média de 850 metros). A coleta das plantas foi realizada em pontos aleatórios para garantir uma boa homogeneidade da área.

O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Giovana Faneco Pereira e sua exsiccata foi depositada no herbário da UTFPR - câmpus Pato Branco - PR com registro HPB1102.

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS RAÍZES

As raízes foram deixadas em estufa de ar circulante a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por, aproximadamente, 5 dias, em seguida, foram escovadas para retirar o excesso de solo e trituradas em moinho de facas.

Foram preparados extratos utilizando 200 g de raízes secas e solventes em ordem crescente de polaridade, éter de petróleo ($30\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$), acetato de etila e metanol, com renovação do solvente em intervalos de 24 h, com média de 3 trocas para cada solvente. O volume de solvente utilizado foi o suficiente para cobrir as raízes e a extração foi realizada a frio. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida (Fisatom 801) e temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS BRUTOS

Em cada placa de Petri foram adicionados 3,0 mL de solução aquosa de cada extrato nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 ppm. Em todos os bioensaios, foi utilizada água destilada como Controle 1 e água destilada acrescida de 3 gotas de solvente utilizado na preparação de cada extrato e Tween 80, como Controle 2. Estes bioensaios foram realizados em triplicata.

3.4.1 Teste do Potencial Osmótico Pelo Método De Schardakow

Em cada solução aquosa dos extratos brutos (100 - 500 ppm) e nos Controles 1 e 2, foi adicionada 1 gota de azul de metileno. Em seguida, foram preparadas soluções aquosas de sacarose nas concentrações de 0,00; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,40 e 0,50 mol L⁻¹. Uma gota (10 µL) de cada extrato foi adicionada às soluções de sacarose, observando-se a movimentação da mesma, sendo avaliada a possível interferência osmótica das soluções dos extratos brutos (MAESTRI et al., 1998). Todas as soluções dos extratos apresentaram valores inferiores a 0,1 MPa, ou seja, são incapazes de gerar efeitos osmóticos prejudiciais à germinação das sementes (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010).

3.4.2 Espécie Receptora

A espécie receptora corda de viola (*Ipomoea grandifolia*) (Figura 10) foi utilizada em todos os bioensaios. As sementes foram adquiridas de empresas de produção de sementes e multiplicadas na área experimental do Departamento de Agronomia da UTFPR – câmpus Pato Branco, passando por processo de limpeza e quebra de dormência.

Figura 10 – Planta e sementes de *Ipomoea grandifolia*



3.4.3 Bioensaio de Germinação de Sementes

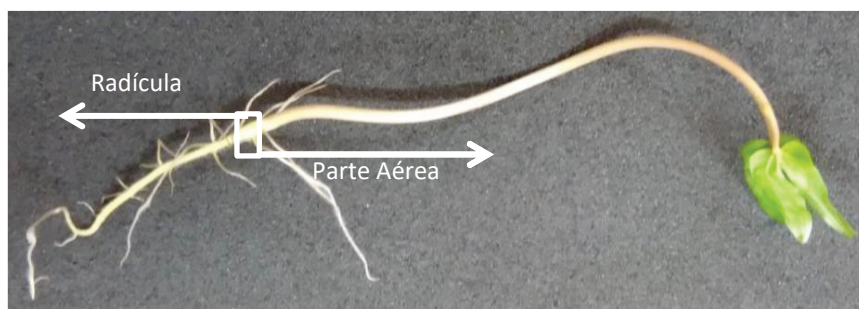
As sementes da espécie receptora foram monitoradas diariamente por um período de 7 dias, sendo consideradas germinadas as sementes com extensão radicular igual ou maior a 2 mm (JUNTILA, 1976). O bioensaio foi conduzido em

câmara de BOD com condições controladas, temperatura de 25 °C (noite) e 30 °C (dia), fotoperíodo de 12 horas (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010). Foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com uma folha de papel filtro qualitativo, as quais receberam 10 sementes da espécie receptora e 3 mL de solução aquosa de cada extrato nas diferentes concentrações, no caso das testemunhas, 3 mL do Controle 1 e do Controle 2.

Com os resultados deste bioensaio calcularam-se as variáveis: tempo médio de germinação (TMG), porcentagem de germinação (PG) e índice de velocidade de germinação (IVG) (APÊNDICE1, pag. 99).

No último dia (7º dia) do bioensaio, mediu-se o comprimento da radícula e da parte aérea das plântulas da espécie receptora (Figura 11) (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010). Com isso, foi possível calcular a média de crescimento da radícula e da parte aérea das plântulas, submetidas aos diferentes tratamentos.

Figura 11 - Plântula de *Ipomoea grandifolia*; exemplo do que foi considerado como parte aérea e como radícula



3.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DAS SUBSTÂNCIAS 2, 9 e 10

O teste alelopático com as substâncias puras (2, 9 e 10) seguiu a mesma metodologia descrita para os testes com os extratos brutos (item 3.4).

Para as substâncias 2, 9 e 10 foram testadas as concentrações de 166,6, 333,3 e 666,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Utilizou-se glifosato (Roundup®) como controle positivo, nas mesmas concentrações e água destilada como controle negativo.

Além da espécie receptora *Ipomoea grandifolia*, utilizada nos testes com os extratos brutos, neste bioensaio utilizou-se também a *Euphorbia heterophylla* (Figura 12). As sementes foram adquiridas de empresas de produção de sementes e multiplicadas na área experimental do Departamento de Agronomia da UTFPR – campus Pato Branco. Para *Euphorbia heterophylla* não foi necessário fazer quebra de dormência.

Figura 12 - Planta e sementes de *Euphorbia heterophylla*



3.6 ANÁLISE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos de raízes de *E. plana* foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana contra sete microrganismos: *Candida albicans* (CCT 776), *Bacillus subtilis* (CCT 2576), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

Os microrganismos foram cultivados durante a noite a 36 °C em meios de cultura específicos (ágar nutriente para as bactérias e ágar Sabouraud Dextrose para *C. albicans*). Os inóculos para os ensaios foram preparados diluindo a massa celular raspada em solução de NaCl a 0,85% e ajustando a escala de McFarland no 0,5. As suspensões celulares foram então diluídas para 10^4 UFC mL⁻¹ para serem utilizadas nos bioensaios.

Testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados em triplicata, de acordo com CLSI (2012, 2008), utilizando microplacas de cultura de tecidos de 96 poços contendo 100 µL do meio de cultura específico (caldo Muller-Hinton para a bactéria e RPMI-1640 para *C. albicans*). As soluções estoque dos extratos brutos foram diluídas para obter concentrações que variaram de 1,0 a 0,015 mg mL⁻¹. Como controle positivo foram utilizados cloranfenicol e nistatina com concentração na faixa de 0,5 a 1,0 mg mL⁻¹.

Os inóculos bacterianos e fúngicos foram adicionados aos poços e as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibia o crescimento microbiano visível, o que foi confirmado pela adição de 20 µL de solução de 0,5% de cloreto de trifênil tetrazólio

(TTC) para bactérias e pela alteração na cor do meio RPMI-1640, de rosa para amarelo, para *C. albicans*.

As concentrações bactericidas e fungicidas mínimas (MBC e MFC, respectivamente) foram determinadas por meio de plaqueamento de 10 µL do material contido no poço correspondente ao do MIC e dos três poços subsequentes de maior concentração, nos meios sólidos adequados para cada microrganismo. Posteriormente, as placas contendo bactérias e leveduras foram incubadas de acordo com a temperatura determinada para cada microrganismo. As MBC e MFC foram definidas como as concentrações mínimas capazes de inibir totalmente o crescimento bacteriano/fúngico (99,9%) nos meios de cultura sólidos específicos (CLSI, 2005).

3.7 PREPARO DE AMOSTRA E CONDIÇÕES DE ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Os extratos brutos das raízes de *E. plana*, das quatro estações do ano e de diferentes polaridades, e a substância **2** foram analisados por CLAE, para isso, foi utilizada coluna Kinetex XB – C18, 100 Å, phenomenex (4,6 x 250 mm, 5 µm). Como fase móvel foi usada água ultrapura (A) e metanol grau HPLC (B), a melhor condição cromatográfica após algumas tentativas foi: 50-100% de B em 50 min, mantendo 100% de B por 10 min, com fluxo constante de 0,8 mL min⁻¹, detecção a 254 nm e volume de injeção de 10 µL.

As amostras foram preparadas dissolvendo 5,2 mg de cada extrato bruto (de acordo com a estação do ano e polaridade) e 1 mg da substância **2**, em 1 mL de metanol grau HPLC. Depois de solubilizadas, as amostras foram filtradas utilizando filtro de seringa de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de tamanho de poro e na sequência foram injetadas.

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística com os dados dos testes alelopáticos foi realizada utilizando-se o programa IBM SPSS Statistics 2.0 e o Matlab. Foi aplicado um delineamento experimental inteiramente casualizado com três réplicas. Os resultados de todas as variáveis calculadas no bioensaio, para todas as estações, para os diferentes tipos de solvente e para as diferentes concentrações dos extratos, foram submetidos ao modelo linear generalizado (MLG), com 95% de significância e à análise dos componentes principais (PCA) utilizando o software Matlab, pré-processamento (autoescalamento) foi aplicado à matriz de dados. Os resultados das

variáveis calculadas no bioensaio com as substâncias **2**, **9** e **10**, também foram submetidos ao MLG, com 95% de significância.

Os dados obtidos por CLAE foram analisados usando o software Matlab. Foi aplicado Pré-tratamento (alinhamento dos picos por Icoshift) e pré-processamento (dados na média) à matriz de dados. Todos os gráficos foram gerados utilizando programa Origin 8.5.

3.9 DICROISMO CIRCULAR VIBRACIONAL

Os espectros de VCD entre 950-1800 cm^{-1} foram obtidos para os compostos **2** e **7** utilizando cela de BaF_2 com volume de 100 μL e caminho óptico de 100 μm . O tempo de aquisição foi de 7h e clorofórmio deuterado foi utilizado como solvente. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética de 7 blocos de aquisição de 1h cada. A linha de base de cada espectro obtido foi corrigida pela subtração do espectro de VCD obtido para o solvente utilizado, nas mesmas condições. A calibração do instrumento foi verificada utilizando os enantiômeros do monoterpeno α -pineno líquido. As condições específicas para essas análises foram: **2** (6,8 mg/130 μL de CDCl_3), e **7** (7 mg/120 μL de CDCl_3).

Para as análises conformacionais foi utilizado uma busca sistemática com o algoritmo de Monte Carlo, no nível de teoria de mecânica molecular, com os campos de força MM+ (Hyperchem) e/ou MMFF (Spartan). As configurações (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*) e (5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*) foram arbitrariamente escolhidas para **2** e **7**, respectivamente. Todos os confôrmeros obtidos, com energia de até 10 kcal/mol em relação a do confôrmero de menor energia, foram selecionados para a etapa de otimização geométrica. Os cálculos de otimização geométrica foram realizados no nível de DFT, utilizando B3LYP/6-31G(d) em fase gasosa, seguida de análise vibracional harmônica no mesmo nível de teoria. Todos os confôrmeros, com energia de até 2,0 kcal/mol em relação a do confôrmero de menor energia, foram selecionados e reotimizados no nível.

Os espectros no IR e de VCD foram calculados no nível B3PW91/6-311G(d,p). As propriedades força dipolar, proporcional às intensidades no IR, e força rotacional, proporcional às intensidades de VCD, foram calculadas no mesmo nível de teoria utilizado para a etapa de otimização geométrica e convertidas em unidade de absortividade molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Os números de onda calculados foram multiplicados pelo fator de correção de anarmonicidade de 0,97 e os espectros foram gerados assumindo bandas Lorentzianas com largura à meia altura de 6 cm^{-1} .

3.10 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Os cristais de **1** (CCDC: 1991736) foram obtidos por difusão lenta em éter de petróleo e diclorometano. Os dados do cristal foram processados no programa APEX3 (1) e a estrutura **1** foi determinada pela rotina de fase intrínseca no programa SHELXT (2A), e refinada pelo método de mínimos quadrados de matriz completa, sobre F^2 , no SHELXL (2B). Todos os átomos, exceto os de hidrogênio, foram refinados anisotropicamente. Em relação ao tratamento dos átomos de hidrogênio, todos foram incluídos em posições calculadas $U(\text{iso})$ ajustado em $1.2 \cdot U(\text{eq})$, para os hidrogênios dos grupos metila, e $U(\text{iso})$ ajustado em $1.5 \cdot U(\text{eq})$ para os demais. No final do refinamento $R_1 = 0,099$ e $wR_2 = 0,290$ para todas as 2844 reflexões e $wR_2 = 0.278$ e $R_1 = 0.084$ (2B) para os dados observados.

Os cristais de **2** (CCDC: 1991737) foram obtidos a partir da evaporação do diclorometano. Os dados do cristal foram processados no programa APEX3 (1) e a estrutura **2** foi determinada pela rotina do método direto no programa SHELX (2A) e refinada pelo método de mínimos quadrados de matriz completa, sobre F^2 , no SHELXL (2B). Todos os átomos, exceto os de hidrogênio, foram refinados anisotropicamente. Em relação ao tratamento dos átomos de hidrogênio, todos foram localizados no mapa de diferença eletrônica e foram refinados isotropicamente e livremente. No final do refinamento $wR_2 = 0.100$ and $R_1 = 0.055$ (2B) para todas as 3278 reflexões e $wR_2 = 0,094$ e $R_1 = 0,041$ para os dados observados.

Os dados cristalográficos completos são apresentados no APÊNDICE 2, pag. 100). Os dados podem ser acessados via www.ccdc.cam.ac.uk.

3.11 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos em éter de petróleo das raízes coletadas na primavera (0,8 g) e no outono (0,8 g), foram submetidos a cromatografia em coluna, utilizando sílica-gel (0,063-0,2 mm; Macherey-Nagel, Germany) como fase estacionária e eluídos com éter de petróleo e éter etílico em diferentes proporções. Foram obtidas 64 e 155 frações de 10 mL cada, do fracionamento dos extratos em éter de petróleo do outono e da primavera, respectivamente. Após análises por CCDA, as frações de cada extrato foram agrupadas de acordo com seus fatores de retenção (fr) (Tabela 1).

O extrato bruto em éter de petróleo das raízes coletadas no verão (1,0 g), foi submetido a cromatografia em coluna flash, utilizando sílica-gel (0,040-0,063 mm;

Merck, Germany) como fase estacionária e eluído com éter de petróleo e éter etílico em diferentes proporções. Foram obtidas 23 frações de 50 mL cada, que foram agrupadas de acordo com seus fatores de retenção (Tabela 1).

Tabela 1 - Frações Resultantes da Cromatografia em Coluna dos Extratos Brutos em Éter de Petróleo Primavera, Verão e Outono

Éter de Petróleo Primavera			Éter de Petróleo Outono			Éter de Petróleo Verão		
Fração final (mg)	Eluente	Subst. Ident.	Fração final (mg)	Eluente	Subst. Ident.	Fração final	Eluente	Subst. Ident.
F1 (13,7)	EP 100%		F1 (1,6)	EP 100%		F1 (19,3)	EP:EE 90:10	
F9 (36,9)	EP:EE 90:10		F5 (36,0)	EP 100%		F3 (10,0)	EP:EE 90:10	
F11 (81,2)	EP:EE 75:25		F17 (21,3)	EP:EE 75:25		F4 (45,6)	EP:EE 75:25	
F14 (31,7)	EP:EE 75:25	9	F18 (31,6)	EP:EE 75:25	1	F5 (130,0)	EP:EE 75:25	
F15 (22,3)	EP:EE 75:25		F19 (12,0)	EP:EE 75:25	1	F6 (75,5)	EP:EE 75:25	
F16 (19,1)	EP:EE 65:35	10	F20 (87,3)	EP:EE 75:25	7	F7 (18,4)	EP:EE 75:25	
F17 (45,5)	EP:EE 65:35	10	F22 (58,6)	EP:EE 65:35	9	F8 (19,1)	EP:EE 65:35	
F18 (69,6)	EP:EE 65:35	10	F25 (18,4)	EP:EE 65:35	9	F9 (48,4)	EP:EE 65:35	2 e 10
F19 (119,2)	EP:EE 65:35	2	F27 (23,0)	EP:EE 65:35	9	F10 (524,2)	EP:EE 50:50	
F20 (172,6)	EP:EE 65:35		F30 (44,6)	EP:EE 65:35	10	F11 (94,2)	EP:EE 50:50	2, 3, 4, 5, 6 e 8
F24 (66,3)	EP:EE 50:50		F34 (36,2)	EP:EE 50:50		F12 (29,3)	EP:EE 40:60	
F36 (17,6)	EP:EE 40:60		F36 (481,1)	EP:EE 50:50	2 e 10	F13 (4,1)	EP:EE 40:60	
F40 (25,0)	EP:EE 40:60		F39 (8,5)	EP:EE 40:60		F14 (10,7)	EP:EE 30:70	
F54 (11,6)	EP:EE 30:70		F41 (5,4)	EP:EE 40:60		F16	EP:EE 10:90	
			F43 (2,7)	EP:EE 40:60				
			F44 (14,4)	EP:EE 40:60				

Em negrito as frações que foram repurificadas e com sublinhado as frações que originaram as substâncias identificadas. EP = Éter de Petróleo; EE = Éter Etilico.

As substâncias **2**, **9** e **10** foram isoladas do extrato bruto em éter de petróleo das raízes coletadas na **primavera** (Fluxograma da purificação - APÊNDICE 3, pag. 101 e 102).

A fração F14 foi submetida a CCDP, eluída com EP:EE 80:20, resultando na substância **9** (9,5 mg).

A fração F16 foi agrupada com a F17 e repurificada por CCDP, utilizando EP:EE 75:25 como fase móvel, resultando nas subfrações F16/17-3 (4,6 mg) e F16/17-6 (15 mg). A subfração F16/17-6 foi repurificada por CCDP, eluída EP:EE 75:25, resultando na subfração F16/17-6-4 (4,5 mg) que foi agrupada com a subfração F16/17-3. Depois de agrupadas a nova fração foi purificação por CCDP, utilizando-se EP:EE 70:30 como fase móvel e resultou na substância **10** (6,9 mg).

A fração F18 foi submetida a CCDP, eluída 4x com EP:EE 70:30 resultando na subfração F18-3 (10,0 mg), que foi repurificada por CCDP, utilizando EP:EE 70:30 como fase móvel e resultou na substância **10** (5,8 mg).

A fração F19 foi submetida a CCDP, eluída 5x com EP:EE 85:15, resultando na substância **2** (11,0 mg).

As substâncias **1**, **2**, **7**, **9** e **10** foram isoladas do extrato em éter de petróleo das raízes coletadas no **outono** (Fluxograma da purificação - APÊNDICE 4, pag. 103, 104 e 105).

A fração F18 foi submetida a CCDP, eluída com EP:DCM 80:20, resultando na substância **1** (3,4 mg).

A fração F19 foi submetida a CCDP, eluída com EP:EE 80:20 resultando na subfração F19-1 (10,0 mg) que foi repurificada por CCDP, utilizando-se EP:DCM 4:6 como fase móvel e resultando na substância **1** (7,0 mg).

A fração F20 foi submetida a CCDP, eluída 3x com EP:DCM 30:70, resultando na subfração F20-3 (42,0 mg) a qual foi repurificada por CCDP, eluída com EP:EE 50:50, resultando na substância **7** (15,0 mg).

A fração F22 foi submetida a CCDP, eluída com EP:EE:DCM (60:30:10), resultando na substância **9** (34,0 mg).

A fração F25 resultante da CC (tabela 1) foi identificada como sendo a substância **9** (18,0 mg).

A fração F27 foi submetida a CCDP, eluída com EP:EE:DCM (80:10:10), resultando na substância **9** (10,0 mg).

A fração F30 foi submetida a CCDP, eluída com EP:EE:DCM (50:10:40), resultando na substância **10** (11,0 mg).

A fração F36 foi submetida a CC, eluída com misturas de EP:AcOEt (80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 10:90), resultando em 110 subfrações de 10 mL

cada, que após análise por CCDA foram agrupadas de acordo com seus fatores de retenção (fr) (Tabela 2).

Tabela 2 - Frações Resultantes da Cromatografia em Coluna da Fração F36 do Extrato das Raízes em Éter de Petróleo Outono

Fração F36 (481,1 mg)			
Fração final	Massa (mg)	Eluente	Substância Identificada
F36-1	1,9	EP:AcOEt 80:20	
F36-6	1,1	EP:AcOEt 80:20	
F36-17	3,6	EP:AcOEt 70:30	
F36-19	4,1	EP:AcOEt 70:30	
F36-22	2,1	EP:AcOEt 70:30	
F36-24	55	EP:AcOEt 70:30	10
F36-33	64	EP:AcOEt 70:30	2
F36-37	56	EP:AcOEt 60:40	
F36-48	19	EP:AcOEt 50:50	
F36-50	100	EP:AcOEt 50:50	
F36-61	31	EP:AcOEt 40:60	
F36-71	18	EP:AcOEt 30:70	
F36-100	6,6	EP:AcOEt 10:90	

Em negrito as frações que foram repurificadas e com sublinhado as frações que originaram as substâncias identificadas. EP = Éter de Petróleo; AcOEt = Acetato de Etila.

A subfração F36-24 foi submetida a CCDP, eluida 2x com EP:DCM:AcOEt (70:20:10), resultando na subfração F36-24-3 (7,8 mg) que foi repurificada por CCDP, usando o sistema de solvente EP:DCM:Clorofórmio (60:30:10), que resultou na substância **10** (2,4 mg).

A subfração F36-33 foi submetida a CCDP, eluida 2x com EP:DCM:AcOEt (70:20:10), resultando na substância **2** (31,0 mg).

As substâncias **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **8** e **10** foram isoladas do extrato em éter de petróleo das raízes coletadas no **verão** (Fluxograma da purificação - APÊNDICE 5, pag. 106).

A fração F9 foi submetida a CCDP, eluida 4x com EP:EE (80:20), resultando na substância **10** (4,0 mg) e na subfração F9-2 (20,0 mg). A subfração F9-2 foi repurificada por CCDP usando EE:DCM (20:80) como sistema de solvente que resultou na substância **2** (5,0 mg).

A fração F11 foi submetida a CCDP, eluida com EP:EE (80:20), resultando nas substâncias **3** (6,8 mg) e **8** (5,0 mg) e nas subfrações F11-2 (14 mg), F11-5 (17,0

mg) e F11-6 (20,5 mg). A subfração F11-2 foi repurificada por CCDP, eluída com DCM:EE (80:20), resultando na substância **2** (5,0 mg).

A subfração F11-5 foi submetida a CCDP, eluída 3x com 100% DCM, resultando nas substâncias **4** (4,0 mg) e **5** (4,0 mg). Enquanto a subfração F11-6 foi repurificada por CCDP, eluída 3x com 100% DCM, resultando na substância **6** (11,0 mg).

O extrato bruto em acetato de etila das raízes coletadas no verão (1,9 g) foi submetido a cromatografia em coluna, utilizando sílica-gel (0,063-0,2 mm; Macherey-Nagel, Germany) como fase estacionária e eluído com hexano, acetato de etila e metanol em diferentes proporções. Foram obtidas 170 frações de 10 mL cada, que após análises por CCDA, foram agrupadas de acordo com seus fatores de retenção (fr) (Tabela 3).

Tabela 3 - Frações Resultantes da Cromatografia em Coluna do Extrato Bruto em Acetato de Etila das raízes Verão

Acetato de Etila Verão			
Fração final	Massa (mg)	Eluente	Substância Identificada
F1	4,8	AcOEt:HEX 30:70	
<u>F22</u>	<u>73,1</u>	AcOEt:HEX 40:60	<u>7</u>
<u>F28</u>	<u>45,0</u>	AcOEt:HEX 40:60	<u>7</u>
<u>F31</u>	<u>16,7</u>	AcOEt:HEX 40:60	
<u>F34</u>	<u>10,8</u>	AcOEt:HEX 40:60	
<u>F36</u>	<u>34,6</u>	AcOEt:HEX 50:50	
<u>F40</u>	<u>18,7</u>	AcOEt:HEX 50:50	
<u>F41</u>	<u>160,0</u>	AcOEt:HEX 50:50	<u>2</u>
<u>F54</u>	<u>64,8</u>	AcOEt:HEX 50:50	<u>6</u>
<u>F61</u>	<u>177,0</u>	AcOEt:HEX 60:40	<u>6</u>
<u>F73</u>	<u>44,6</u>	AcOEt:HEX 70:30	
F78	36,6	AcOEt:HEX 70:30	
F82	150,0	AcOEt:HEX 80:20	
F100	86,6	AcOEt:HEX 90:10	
F108	81,3	AcOEt:MeOH 90:10	
F121	44,1	AcOEt:MeOH 70:30	
F139	3,5	AcOEt:MeOH 30:70	
F140	125,0	AcOEt:MeOH 30:70	
F143	54,2	AcOEt:MeOH 30:70	
F147	414,7	AcOEt:MeOH 30:70	
F156	26,7	MeOH 100%	
F159	150,0	MeOH 100%	
F170	54,0	MeOH 100%	

Em negrito as frações que foram repurificadas e com sublinhado as frações que originaram as substâncias identificadas. HEX = Hexano; AcOEt = Acetato de Etila; MeOH = Metanol.

As substâncias **2**, **6** e **7** foram isoladas do extrato em acetato de etila das raízes coletadas no verão (Fluxograma da purificação - APÊNDICE 6, pag. 107 e 108).

A fração F22 foi purificada por CCDP, eluída com Hex:DCM:AcOEt (80:10:10), resultando na substância **7** (9,5 mg).

A fração F28 foi submetida a CCDP, eluída com Hex:DCM:AcOEt (80:10:10), resultando na subfração F28-4 (6,9 mg) que foi repurificada por CCDP, usando como fase móvel Hex:DCM (70:30) e resultou na substância **7** (3,6 mg).

A fração F41 foi submetida a CCDP, eluída com Hex:DCM:AcOEt (70:20:10), resultando na substância **2** (46,0 mg).

A fração F54 foi purificada por CCDP, eluída com Hex:AcOEt (70:30), resultando na subfração F54-5 (22,7 mg) que foi submetida a CCDP, usando como fase móvel DCM:AcOEt (80:20), resultando na substância **6** (6,3 mg).

A fração F61 foi submetida a CCDP, eluída com Hex:AcOEt (60:40), resultando na subfração F61-5 (39,5 mg) que foi repurificada por CCDP, usando Hex:DCM:AcOEt (20:60:20) como fase móvel e resultou na substância **6** (18,0 mg).

A fração F73 foi submetida a CCDP, eluída com DCM:AcOEt (70:30), resultando na subfração F73-2 (8,0 mg) que foi repurificada por CCDP, usando Hex:AcOEt (90:10) como fase móvel (em processo de identificação).

3.11.1 Dados Espectroscópicos e Espectrométricos das Substâncias **1**, **2**, **7**, **9** e **10**

(5*S*,8*R*,9*S*,10*R*) *Neocassa-12(13),15-dien-14-ona (1)*: $[\alpha]^{20}_D + 50$ (*c* 0,14, CHCl₃); UV-vis (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 216 (3,62), 247 (3,35), 276 (3,06) nm; IR (ZnSe) ν_{\max} 2929, 2866, 1732, 1141, 736 cm⁻¹; para dados de RMN 1D e 2D ver Tabela 7; HRESIMS *m/z* 287,2360 [M+H]⁺ (calcd para C₂₀H₃₁O 287,2369). Dados cristalográficos em APÊNDICE 101.

(5*R*,8*R*,9*S*,10*R*) *Neocassa-12(13),15-dieno-3,14-diona (2)*: $[\alpha]^{20}_D + 4$ (*c* 0,22, CHCl₃); UV-vis (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 217 (3,14), 258 (3,06) nm; IR (ZnSe) ν_{\max} 2938, 2865, 1703, 1455, 1384, 737 cm⁻¹; para dados de RMN 1D e 2D ver Tabela 8; HRESIMS *m/z* 301,2160 [M+H]⁺ (calcd para C₂₀H₂₉O₂ 301,2162). Dados cristalográficos em APÊNDICE 101.

Neocassa-12(17),15-dien-3-ona (7): $[\alpha]^{20}_D + 23$ (*c* 0,33, CHCl₃); UV-vis (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 217 (3,67) nm; IR (ZnSe) ν_{\max} 2927, 2854, 1704, 1454, 1386, 918 cm⁻¹; para dados de RMN 1D e 2D ver Tabela 13; HRESIMS *m/z* 287,2360 [M+H]⁺ (calcd para C₂₀H₃₁O 287,2369).

14-Hidroxineocassa-12(17),15-dieno (9): $[\alpha]^{20}_D + 33$ (c 0,73, CHCl_3); UV-vis (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 213 (3,05), 235 (2,87) nm; IR (ZnSe) ν_{max} 3440, 3074, 2924, 2863, 1462, 1382, 917 cm^{-1} ; para dados de RMN 1D e 2D ver Tabela 15; HRESIMS m/z 289.2526 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd para $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}$ 289,2525).

3-Hidroxineocassa-12(17),15-dieno (10): $[\alpha]^{20}_D + 20$ (c 0,11, CHCl_3); UV-vis (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 212 (2,75), 327 (1,28) nm; IR (ZnSe) ν_{max} 3402, 3072, 2925, 2850, 1449, 1036, 890 cm^{-1} ; para dados de RMN 1D e 2D ver Tabela 16; HRESIMS m/z 289,2224 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd para $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}$ 289,2525).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 4 apresenta as massas dos extratos brutos obtidos das raízes de *E. plana* coletadas na primavera, no verão, no outono e no inverno, extraídas com solventes de baixa, média e alta polaridade.

Tabela 4 - Massa dos Extratos das Raízes de *E. plana* Coletadas nas Quatro Estações do Ano/2016/2017

Estação	Éter de Petróleo	Acetato de Etila	Metanol	Rendimento total %
Primavera	1,3 g	2,5 g	4,2 g	4,0
Verão	1,8 g	3,1 g	5,1 g	5,0
Outono	1,6 g	2,2 g	7,2 g	5,5
Inverno	1,9 g	1,9 g	6,0 g	4,9

4.1 TESTES ALELOPÁTICOS COM OS EXTRATOS BRUTOS

As variáveis dependentes testadas nos bioensaios foram: comprimento da radícula (CR), comprimento da parte aérea (CPA), porcentagem de germinação (PG), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG). Os fatores considerados nestes experimentos foram: estações do ano, tipo de solvente e concentração dos extratos. O conjunto de dados no delineamento experimental foi analisado por modelos lineares generalizados (MLG). Nesta discussão foram analisados somente os fatores principais e as interações que apresentaram diferenças estatísticas significativas, ao intervalo de confiança de 95% (Tabela 5). Os dados das variáveis de germinação (PG, TMG e IVG) foram ajustados à distribuição gama com função de ligação log e as variáveis de crescimento (CR e CPA), foram ajustadas à distribuição normal.

Tabela 5 - Fatores que Resultaram em Diferenças Estatísticas Significativas para as Variáveis Dependentes de Crescimento (CR e CPA) e de Germinação (PG, IVG e TMG) da Espécie Receptora *I. grandifolia*

Fatores	Teste Qui-quadrado de Wald	Graus de liberdade	p-valor
CR			
Estação	220,350	3	0,000
Solvente	26,102	2	0,000
Tratamento	34,091	6	0,000
Estação*Solvente	15,804	6	0,015
CPA			
Estação	180,038	3	0,000
Tratamento	30,060	6	0,000
Estação*Solvente	16,339	6	0,012
Solvente *Tratamento	22,480	12	0,032
PG			
Estação	28,368	3	0,000
Solvente	7,017	2	0,030
Estação*Solvente	14,633	6	0,023
IVG			
Estação	226,875	3	0,000
TMG			
Estação	389,783	3	0,000

CR = Comprimento da Radícula; CPA = Comprimento da Parte Aérea; PG = Porcentagem de Germinação; IVG = Índice de Velocidade de Germinação; TMG = Tempo Médio de Germinação.

4.1.1 Efeito dos Extratos de Raízes de *Eragrostis plana* Sobre o Crescimento de *Ipomoea grandifolia*

O modelo linear generalizado para o CPA (Equação 1) e CR (Equação 2) apresentou uma medida de ajuste AIC (Akaike Information Criterion) igual a 781,84 e 721,52, respectivamente.

$$\hat{y} = e^{3,459+2,299*outono+2,000*primavera+1,067*Controle1-1,447*acetato*Controle1-1,373*eter*C500}$$

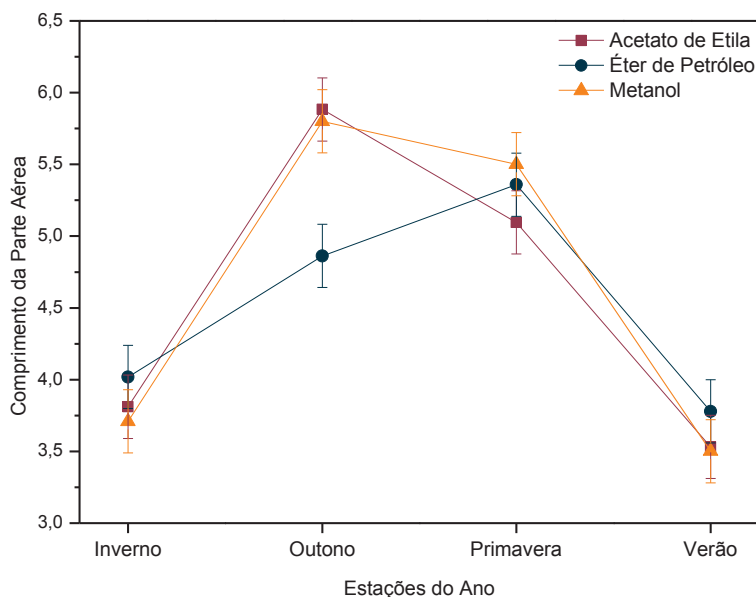
Equação 1

$$\hat{y} = e^{3,365-0,631*inverno+1,921*outono+1,738*primavera-0,691*C100-0,636*C200-0,842*C300-0,786*C400-1,207*C500-1,430*outono*eter-1,216*primavera*eter}$$

Equação 2

A análise da interação estação vs solvente, para a variável CPA, revelou que na estação outono o extrato em éter de petróleo apresentou o maior poder inibitório, em comparação com os extratos em acetato de etila e metanol. Contudo, para as outras estações não se observam diferenças significativas nos CPA de *I. grandifolia* entre os diferentes solventes utilizados para a preparação dos extratos (Figura 13).

Figura 13 - Interação Estação vs. Solvente para a Variável Comprimento da Parte Aérea (CPA)



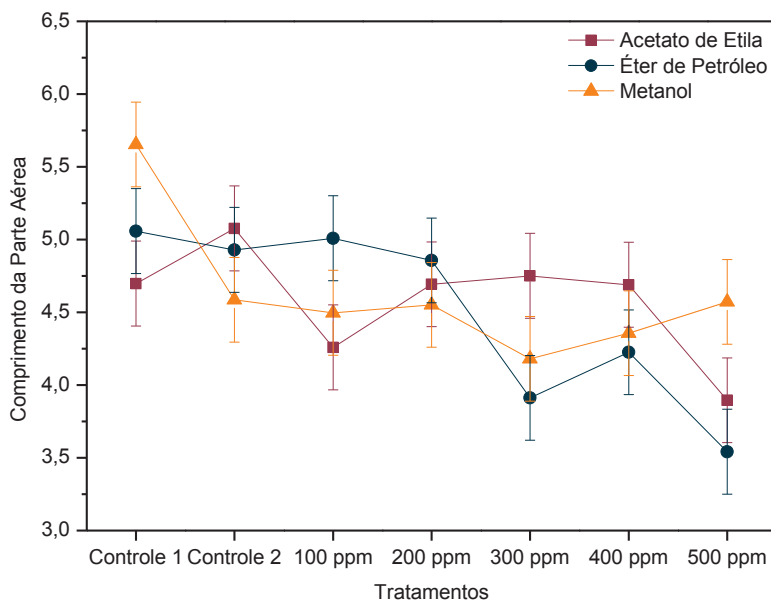
Os menores valores de CPA foram observados para a estação verão, e foram significativamente diferentes das estações outono e primavera. A razão de chance foi calculada para todos os coeficientes desses modelos gerados por MLG (equações 1 e 2), a equação 1 mostra que a primavera e o outono apresentam 6 e 9 vezes mais chances de resultarem em CPA maiores do que o verão, respectivamente.

Filip et al. (2016), estudando a dinâmica sazonal dos aleloquímicos de *Helianthus tuberosus* L., observaram que os efeitos alelopáticos dessa espécie são mais fortes no início do verão e no final do outono, quando os aleloquímicos se acumulam na rizosfera. O estímulo positivo no CPA de *Egeria densa* influenciado por extratos de raízes coletadas no outono foi relatado por Thiébaut et al. (2018), quando estudaram o efeito sazonal de extratos de *L. hexapetala*.

A análise da interação solvente vs. tratamento revelou que com o extrato em éter de petróleo a razão de chance de CPA ser maior no tratamento de 500 ppm é, em média 75% menor quando comparada com o Controle 2 (Equação 1). O CPA observado com a concentração de 500 ppm também diferiu dos valores obtidos com Controle 1, 100 e 200 ppm para o extrato em éter de petróleo. As concentrações de

300 ppm e 400 ppm do extrato metanólico também resultaram em valores de CPA inferiores aos obtidos com Controle 1 (Figura 14).

Figura 14 - Interação Solvente vs. Tratamento para a Variável Comprimento da Parte Aérea (CPA).

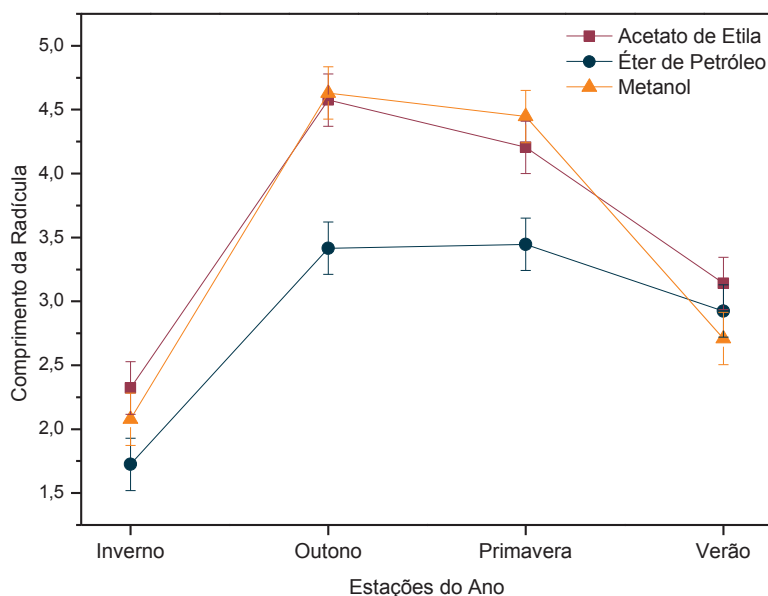


Segundo Dotto et al. (2017), o extrato de *E. plana* reduziu a germinação e o crescimento inicial de alface, tomate e pimentão, sendo que o maior efeito alelopático ocorreu na concentração mais elevada (0,1g mL⁻¹).

Observa-se na análise da equação 1, que para o extrato em acetato de etila existe uma diferença acentuada entre os valores de CPA obtidos com o Controle 1 e 2. Nota-se que com Controle 1 a razão de chance de CPA ser maior é, em média 76% menor quando comparada ao Controle 2, acredita-se que a adição de tween 80 e acetato de etila no Controle 2 pode estar exercendo efeito estimulatório ao CPA das plantas de *I. grandifolia*.

Para a variável CR, a análise da interação estação vs solvente revelou que, o extrato em éter de petróleo também foi o responsável pela maior inibição dessa variável nas estações outono e primavera, em relação aos demais extratos dessas estações (Figura 13). Em ambas as estações a razão de chance de CR ser maior com extrato em éter de petróleo é, em média 70% menor quando comparada com extrato em metanol. Nos períodos de inverno e verão não se observaram diferenças nos valores dessa variável entre os distintos extratos de raízes de *E. plana* (Figura 15).

Figura 15 - Interação Espécie vs. Solvente para a Variável Comprimento da Radícula (CR).



Nota-se que os valores de CR foram menores na estação inverno, sendo estatisticamente diferentes das outras estações do ano. A equação 2 mostra que no inverno a chance de CR ser maior é em média 47% menor quando comparada ao verão. Enquanto, a primavera e o outono apresentam 5 e 6 vezes mais chances de resultarem em CR maiores do que o verão, respectivamente.

Considerando as concentrações testadas, nota-se que as menores medidas para o CR foram observadas quando se utilizou o extrato de raízes de *E. plana* na concentração de 500 ppm, sendo estatisticamente diferente dos Controles 1 e 2. Segundo a equação 2 o CR com os tratamentos 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm e 400 ppm possui aproximadamente 50% menos chances de apresentarem CR maiores que o Controle 2, enquanto, no tratamento com 500 ppm a razão de chance de CR ser maior é, em média 70% menor quando comparada ao Controle 2.

A influência negativa causada pelo *E. plana* no CR e no comprimento do hipocótilo de outras plântulas também foi relatada no trabalho de Bittencourt et al. (2018).

A partir desses resultados, pode-se destacar que a aplicação de extratos de raízes coletadas no verão e no inverno resultou nos menores valores das variáveis de crescimento. Considerando que ambas as estações normalmente apresentam condições climáticas extremas, os resultados obtidos indicam que fatores ambientais abióticos são capazes de induzir mudanças na produção de diferentes classes de metabólitos especializados, efeito já destacado no trabalho de Sampaio et al. (2016).

Franco et al. (2016) confirmaram a influência da variação sazonal sobre a composição de substâncias e sobre o potencial alelopático de folhas de *Copaifera*

langsdorff. Em outro estudo, antraquinonas foram encontradas em amostras de *Luehea candicans* apenas em material coletado durante a estação seca, enquanto saponinas foram detectadas apenas em amostras coletadas na estação chuvosa (PINTO et al., 2016).

A ação dos aleloquímicos está relacionada com a concentração e classificação dos mesmos. Por exemplo, uma baixa concentração de dibutylftalato aumenta a absorção de N, mas diminui a de P e K. No entanto, uma alta concentração desse composto inibe a absorção de N, P e K. Similarmente, uma baixa concentração de difenilamina estimula a absorção de N e K, mas inibe a absorção de P pelas raízes de tomate (CHENG; CHENG, 2015). A absorção de todos os macronutrientes, nitrogênio, fósforo e potássio é essencial ao crescimento e desenvolvimento das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

4.1.2 Efeito dos Extratos de Raízes de *Eragrostis plana* Sobre a Germinação de *Ipomoea grandifolia*

O modelo linear generalizado para PG (equação 3), IVG (equação 4) e TMG (equação 5) obteve uma medida de ajuste AIC igual a 2008,92; 1348,37 e 169,97, respectivamente.

\hat{y}

$$= e^{4,255+0,207*outono+0,229*primavera+0,127*acetato+0,139*eter-0,178*outono*eter-0,166*primavera*eter}$$

(Equação 3)

$$\hat{y} = e^{2,864-0,307*inverno+0,212*outono+0,111*primavera}$$

(Equação 4)

$$\hat{y} = e^{0,381+0,473*inverno-0,295*outono}$$

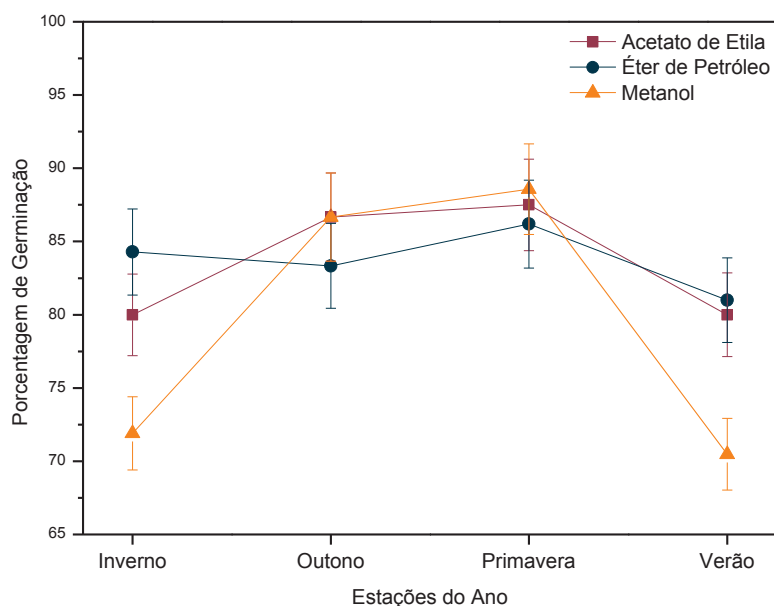
(Equação 5)

A razão de chance foi calculada para todos os coeficientes desses modelos gerados por MLG (equações 3, 4 e 5). Para a variável PG, a análise da interação estação vs. solvente, nos mostra que no outono e na primavera a razão de chance de PG ser maior com extratos em éter de petróleo é, em média 15% menor comparada com extratos metanólicos de ambas as estações (Equação 3, Figura 14).

Contudo, observa-se que para as raízes de *E. plana* coletadas no inverno, os valores de PG obtidos com o extrato metanólico são estatisticamente menores do que os obtidos com o extrato em éter de petróleo. Os menores valores para PG são

observados quando se utiliza o extrato metanólico do verão, este por sua vez, difere-se dos extratos em acetato de etila e éter de petróleo, ao nível de significância de 5% (Figura 16). Sendo assim, fica evidente que a influência do solvente utilizado na extração depende da estação do ano em que as raízes de *E. plana* foram coletadas.

Figura 16 - Interação Estação vs. Solvente para a Variável Porcentagem de Germinação (PG).

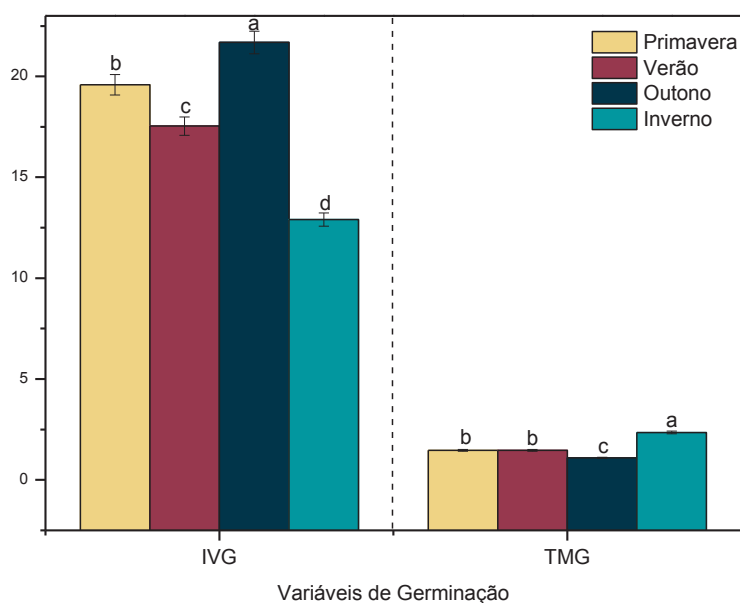


A equação 3 também nos mostra que os extratos das estações outono e primavera apresentam, aproximadamente, 1,24 vezes mais chances de resultarem em valores de PG maiores comparados com a estação verão.

Os menores valores de IVG para *I. grandifolia* são observados no inverno, neste caso todas as estações apresentam valores estatisticamente diferentes entre si (Figura 15). Por meio da equação 4 observa-se que no inverno a razão de chance de IVG ser maior é, em média 26% menor quando comparada ao verão, enquanto o outono e a primavera apresentam 1,24 e 1,12 vezes mais chances de resultarem em valores de IVG maiores que o verão, respectivamente.

Por fim, observa-se que os maiores valores de TMG são obtidos com raízes de *E. plana* coletadas no inverno, sendo esses diferentes das demais estações (Figura 17). A equação 5 mostra que o inverno apresenta 1,6 vezes mais chances de resultar em TMG maiores comparado com o verão, enquanto, no outono a razão de chance de TMG ser maior é, em média 26% menor quando comparada ao verão.

Figura 17 - IVG e TMG de *I. grandifolia* em Função da Estação. Letras Diferentes Significam que as Médias são Diferentes com 95% de Significância



Pinto e Kolb (2016) estudando os extratos de *Luehea candicans*, observaram que o extrato obtido com material coletado durante a estação chuvosa diminuiu a capacidade de germinação e a velocidade de germinação das espécies receptoras, confirmando que o efeito fitotóxico, bem como a quantidade e composição de metabólitos secundários, diferem sazonalmente.

Fiorenza et al. (2016), averiguaram que extratos aquosos de partes aéreas de *E. plana* afetaram a PG e o IVG. Segundo estes pesquisadores, os extratos dessa espécie atuaram inibindo o vigor das sementes de milho, aveia-branca, azevém-anual, trevo-vermelho e cornichão, o que confirma o potencial alelopático do *E. plana*.

Ferreira, Medeiros e Soares (2008), estudando os efeitos alelopáticos de *E. plana* durante a decomposição dos tecidos vegetais constataram que quanto maior o nível de cobertura menor a germinação e o IVG das sementes de grama-de-forquilha.

O desenvolvimento vegetal é regulado por seis tipos principais de hormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e brassinosteroides, os quais, podem ser afetados negativamente pela presença dos aleloquímicos. As alterações desses reguladores de crescimento podem influenciar na germinação de sementes e crescimento de plântulas (CHENG; CHENG, 2015; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Alterações nos níveis de AIA (ácido indol-3-acético), principal auxina natural, danificam o sistema de regulação do crescimento e inibem o crescimento de plântulas (CHENG; CHENG, 2015).

Os aleloquímicos exercem diferentes efeitos sobre a síntese, funções e atividades de várias enzimas. O ácido clorogênico, ácido caféico e catecol, por

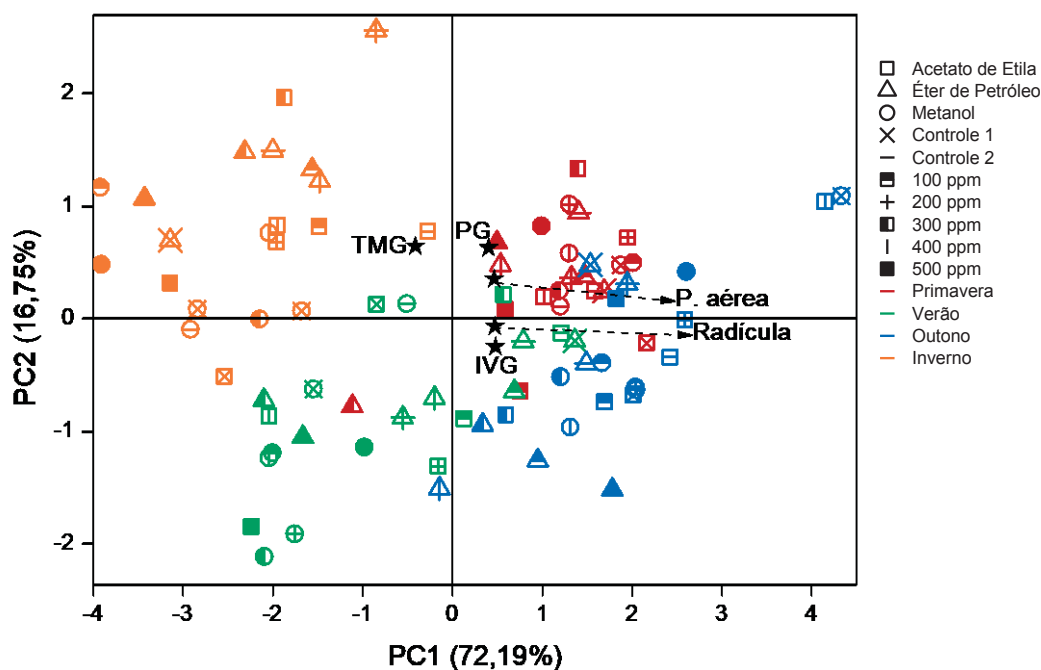
exemplo, podem inibir a enzima λ -fosforilase, envolvida na germinação de sementes (CHENG; CHENG, 2015).

4.1.3 Análise de Componentes Principais dos Dados Obtidos nos Testes Alelopáticos com os Extratos Brutos

Os dados obtidos com os testes alelopáticos também foram analisados por PCA, uma ferramenta quimiométrica muito útil na análise de amostras complexas. Por meio da PCA é possível verificar a formação de grupos entre as amostras e quais variáveis são responsáveis por esses agrupamentos (JESUS et al., 2019).

A matriz X é formada por 5 colunas e 84 linhas. As duas primeiras PCs juntas explicam 88,94% da variância total dos dados (PC1 72,19% e PC2 16,75%) por isso foram escolhidas para visualizar as correlações entre as amostras (Figura 18).

Figura 18 - PCA dos Testes Alelopáticos dos Extratos Brutos de Raízes de *E. plana*, Coletadas nas Quatro Estações do Ano, Obtidos com Solventes de Diferentes Polaridades (Éter de Petróleo, Acetato de Etila e Metanol) e Testados em 5 Concentrações Diferentes (100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm e 500ppm) – Gráfico de Scores e de Loadings.



Pela PC1 foi possível observar separação entre as estações do ano, pois as amostras correspondentes aos extratos de primavera e outono estão do lado positivo da PC1, enquanto que, todas as amostras de inverno e grande parte das amostras de verão estão do lado negativo da PC1. A PC2 também mostra que existe diferença entre as estações do ano, pois a maioria das amostras de primavera e inverno

encontra-se no lado positivo da PC2, enquanto que, amostras de outono e verão encontram-se no lado negativo da PC2.

Os *loadings* segundo a PC1 mostram que os maiores valores para as variáveis PG, IVG, CPA e CR são observados com extratos de primavera e outono. E os menores valores dessas variáveis são obtidos com extratos de inverno e verão. Essa afirmação está de acordo com o observado pelo MLG (Modelo Linear Generalizado), onde o CPA e a PG foram menores com extratos de verão e o CR e o IVG foram menores com extratos de inverno, e que, os valores dessas quatro variáveis são maiores com extratos de outono e primavera.

Essa afirmação também é comprovada pela análise dos *loadings* segundo a PC2, pois se observa que os menores valores de PG e CPA são obtidos com extratos de verão, enquanto o IVG e o CR são menores com extratos de inverno.

A PC1 mostra que os extratos de inverno apresentaram os maiores valores de TMG e os extratos de outono e primavera resultam nos menores valores dessa variável. Novamente os resultados corroboram com os observados no MLG.

Tanto a análise do MLG quanto a análise da PCA mostram que os extratos de raízes coletadas no verão e no inverno apresentam maior potencial alelopático, pois são capazes de aumentar o TMG e diminuir a PG, o IVG, o CR e o CPA da espécie receptora.

Esses resultados estão descritos no artigo aceito no Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2020.

4.2 ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

Os extratos brutos de *E. plana* foram submetidos a análise de suas atividades antimicrobianas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM), a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo, e as Concentrações Fungicida e Bactericida Mínimas (CFM e CBM), concentrações mínimas responsáveis pela morte de pelo menos 99,9% dos inóculos iniciais, foram avaliadas (Tabela 6).

Neste trabalho, foram avaliadas atividades até 2,0 mg mL⁻¹ sendo considerados inativos os extratos com valores de CIM acima disto. Os extratos brutos obtidos com metanol apresentaram CIM maior que 2,0 mg mL⁻¹, assim como, não se observa inibição das bactérias *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* e *S. epidermidis* por nenhum extrato, sendo assim, não foram apresentados na tabela 6.

Os melhores resultados de inibição foram observados para a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, em que os extratos em éter de petróleo (exceto inverno) e acetato

de etila primavera, inibiram moderadamente esse microrganismo, enquanto o extrato de acetato de etila verão inibiu fortemente.

Para a bactéria Gram-negativa *E. coli*, os extratos em acetato de etila (exceto inverno) apresentaram inibição moderada, enquanto o extrato em éter de petróleo primavera e acetato de etila inverno apresentaram baixa inibição dessa bactéria.

Para o fungo *C. albicans* verificou-se que os extratos brutos em éter de petróleo em todas as estações do ano inibiram fracamente o microrganismo. Assim como, para a bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, os extratos em éter de petróleo (exceto inverno) e acetato de etila (todas as estações) inibiram fracamente esse microrganismo.

Tabela 6 - Atividades antimicrobianas (CIM - concentração inibitória mínima) dos extratos brutos de *E. plana* – Entre parênteses CBM (Concentração bactericida mínima)

Extrato	<i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EP Outono	2,0	2,0 (CBM = 2,0)	1,0	*
EP Primavera	2,0	2,0 (CBM = 2,0)	1,0 (CBM = 2,0)	2,0
EP Verão	2,0	2,0 (CBM = 2,0)	1,0	*
EP Inverno.	2,0	*	2,0	*
AE Outono	*	2,0 (CBM = 2,0)	2,0	1,0
AE Primavera	*	2,0 (CBM = 2,0)	1,0	1,0
AE Verão	*	2,0 (CBM = 2,0)	0,5	1,0
AE Inverno.	*	2,0 (CBM = 2,0)	2,0	2,0

*=CIM >2,0 mg mL⁻¹; EP = éter de petróleo; AE = acetato de etila. Os valores de CFM e CBM >2,0 mg mL⁻¹ não foram mostrados.

Todos os extratos brutos, com exceção do extrato em éter de petróleo inverno, apresentaram CBM igual a CIM (2,0 mg mL⁻¹) para *B. subtilis*. Já o extrato em éter de petróleo primavera apresentou CBM maior que a CIM (1,0 mg mL⁻¹) para *S. aureus*.

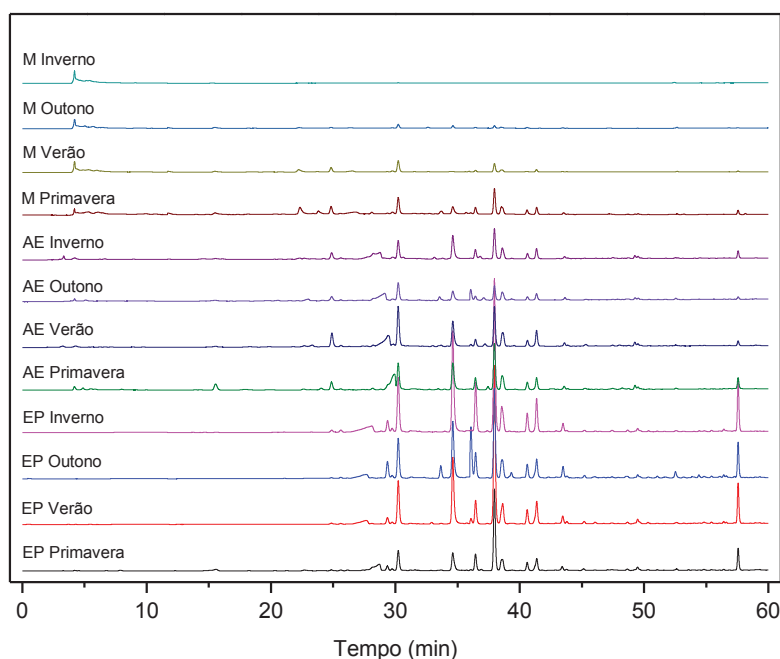
Em outro estudo, o extrato aquoso de folhas de *E. plana* apresentou baixa atividade antimicrobiana contra *S. epidermidis* e *S. aureus* e o extrato da raiz somente foi ativo contra *S. epidermidis* (FAVARETTO et al., 2016).

Pode-se destacar que *S. aureus* foi o microrganismo mais sensível frente a todos os extratos testados, podendo-se destacar o extrato em acetato de etila verão como o que mais inibiu essa bactéria.

4.3 ANÁLISES DOS EXTRATOS BRUTOS E DA SUBSTÂNCIA 2 POR CLAE

Os extratos brutos das raízes de *E. plana* coletadas nas quatro estações do ano e obtidos com diferentes solventes foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Figura 19).

Figura 19 - Cromatogramas dos Extratos Brutos Obtidos das Raízes de *E. plana* Coletadas nas Quatro Estações do Ano e Utilizando Diferentes Solventes: Éter de Petróleo (EP), Acetato de Etila (AE) e Metanol (M).



Todos os extratos foram analisados nas mesmas condições cromatográficas e com a mesma quantidade de massa, como descrito no item 3.7.

A análise dos cromatogramas dos extratos brutos em éter de petróleo mostra pouca diferença no que diz respeito ao perfil químico nas diferentes estações. A única diferença verificada é no cromatograma do extrato de outono, onde se observa a presença de dois sinais (33,63 min e 39,31 min) que não são encontrados nos demais extratos. Contudo, a diferença mais significativa está associada à intensidade dos sinais, pois observa-se que nos extratos de verão e de inverno a intensidade dos sinais é maior que a observada nos extratos de primavera e outono.

Os cromatogramas dos extratos em acetato de etila também mostra pouca diferença no que diz respeito ao perfil químico dos mesmos, em relação as diferentes estações. A única diferença verificada é no cromatograma do extrato de primavera, onde se observa a presença de um sinal (15,902 min) que não é encontrado nos demais extratos. Contudo, novamente, a diferença mais significativa está relacionada à intensidade dos sinais, pois observa-se que nos extratos de primavera e verão a

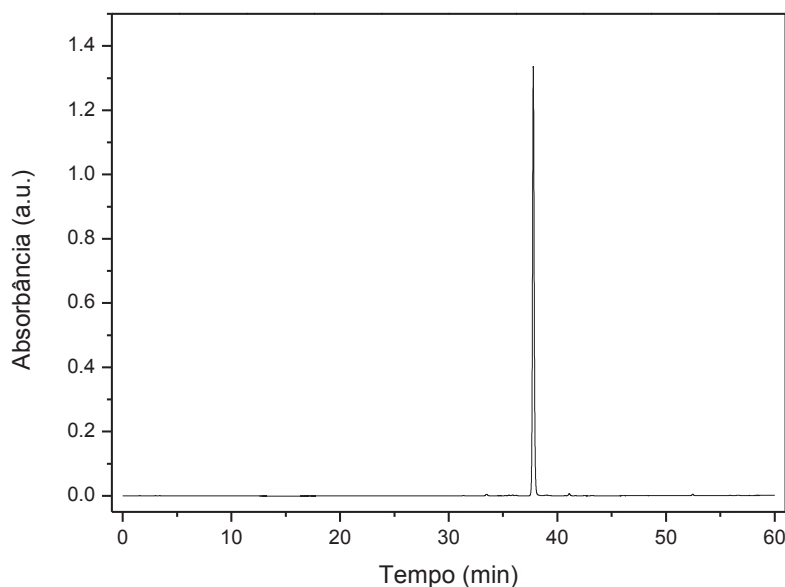
intensidade dos sinais é maior que a observada nos extratos de outono e inverno, sendo que, o extrato de outono apresenta a menor intensidade de sinais.

A análise dos cromatogramas dos extratos em metanol mostra muita diferença no que diz respeito ao perfil químico. Observa-se que o extrato de primavera é o mais rico em termos de variedade de substâncias químicas, seguido dos extratos de verão e outono, já para o inverno observa-se o menor número de substâncias.

Quando se compara o perfil químico dos extratos em função do solvente utilizado na extração, observa-se muita semelhança, com exceção do extrato metanólico de inverno, que se diferencia dos demais por apresentar poucos picos. Novamente, a maior diferença está associada à intensidade dos sinais, nota-se que os extratos em éter de petróleo apresentam nitidamente a maior intensidade das absorções.

A substância **2** pode ser isolada em todos os extratos brutos de *E. plana* fracionados neste trabalho e, por isso, foi analisada por CLAE nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para os extratos brutos (Figura 20).

Figura 20 - Cromatograma da Substância **2**



Essa substância apresenta tempo de retenção de 37,98 min e está presente majoritariamente em todos os extratos em éter de petróleo, nos extratos em acetato de etila primavera e inverno e no extrato metanólico de primavera. A elucidação estrutural dessa substância será mostrada na sequência deste trabalho.

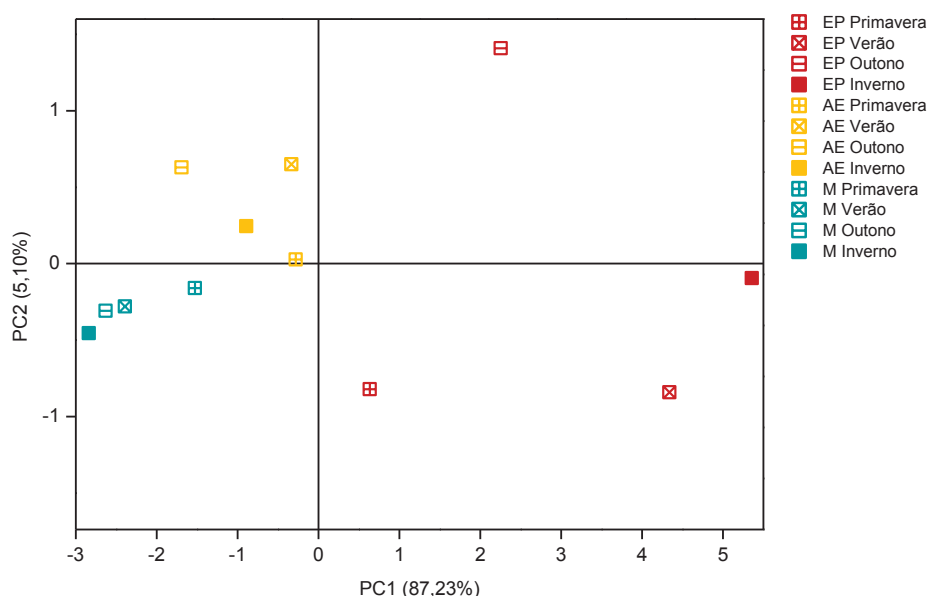
Uma melhor interpretação dos dados obtidos por CLAE foi realizada com a ajuda da PCA, essa análise foi muito importante na diferenciação entre os solventes utilizados na extração e entre as estações de coleta.

4.3.1 Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis - PCA) dos Extratos Brutos Analisados por CLAE

Os dados de CLAE dos extratos obtidos com diferentes solventes, a partir das raízes coletadas nas quatro estações do ano foram comparados pela análise dos componentes principais (PCA), a fim de verificar suas semelhanças e/ou diferenças.

A matriz de dados X é formada por 36000 colunas e 12 linhas. As duas primeiras PCs juntas explicam 92,33% da variância total dos dados (PC1 87,23% e PC2 5,10%) por isso foram escolhidas para visualizar as correlações entre as amostras (Figura 21).

Figura 21 - PCA dos Cromatogramas dos Extratos Brutos de *E. plana* Obtidos com Diferentes Solventes de Raízes Coletadas nas Quatro Estações do Ano. EP = Éter de Petróleo, AE = Acetato de Etila e M = Metanol.



Pela análise da PC1 pode-se observar separação entre as amostras obtidas com diferentes solventes. As amostras em éter de petróleo encontram-se no quadrante positivo da PC1, enquanto as amostras em acetato de etila e metanol encontram-se no quadrante negativo dessa PC, sugerindo diversidade em termos de metabólitos secundários entre esses extratos.

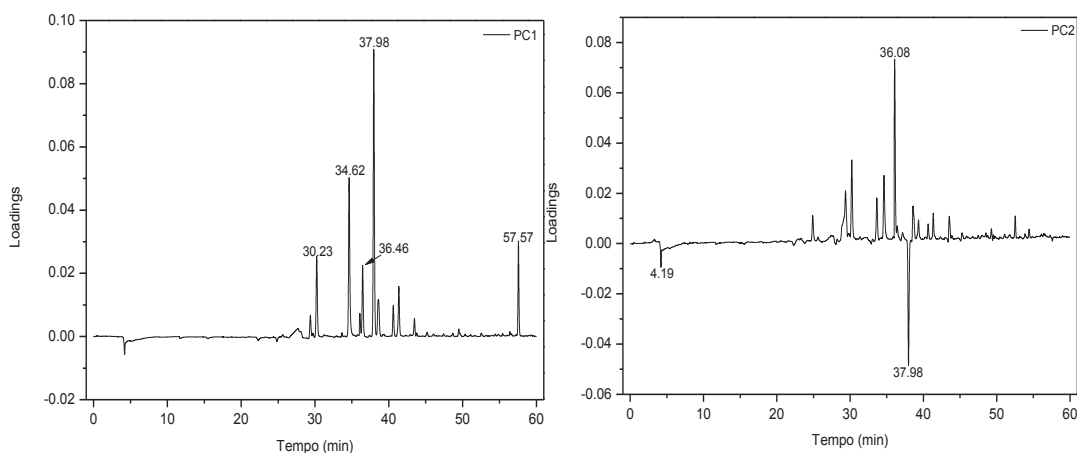
A análise da PC2 também mostra que existe diferença entre o solvente utilizado na extração, pois, nota-se que as amostras em acetato de etila são diferentes das amostras em metanol nessa PC. A PC2 também mostra que existe separação entre as estações do ano, quando observamos os extratos em éter de petróleo, pois o outono encontra-se no quadrante positivo da PC2, enquanto a primavera, o verão e o inverno encontram-se no quadrante negativo dessa PC.

Mesmo na PC1 observa-se que as amostras em éter de petróleo encontram-se distantes umas das outras, o que sugere a diferença na composição química dos extratos em função da estação de coleta das raízes. Nos testes alelopáticos observou-se que os melhores resultados foram obtidos com extratos em éter de petróleo de raízes coletadas no verão e no inverno, dependendo da variável estudada. Já para os outros solventes não se observa muita diferença no que diz respeito à sazonalidade.

A análise do gráfico de *loading* da PCA ajuda a explicar quais variáveis foram mais importantes para a separação das amostras no gráfico de *scores*. Os extratos em éter de petróleo (lado positivo da PC1) são caracterizados, principalmente, por bandas cromatográficas com tempos de retenção de 30,23; 34,62; 37,98; 36,46 e 57,57 min (Figura 22, esquerda).

Os extratos em de éter de petróleo primavera, verão e inverno e os extratos metanólicos, localizadas no lado negativo da PC2 são caracterizados pelo sinal cromatográfico com tempo de retenção de 37,98 min. Enquanto os extratos em acetato de etila e éter de petróleo outono são caracterizados, principalmente, pelo sinal cromatográfico em 36,08 min (Figura 22, direita).

Figura 22 - Gráfico de loadings – PC1 (esquerda) e PC2 (direita)



Pode-se sugerir que os resultados observados nos testes alelopáticos tem relação com a diferença no perfil químico dos extratos brutos, uma vez que, os extratos em éter de petróleo que apresentaram melhor atividade alelopática são quimicamente diferentes dos extratos em acetato de etila e metanol. E o extrato metanólico que apresentou a menor porcentagem de germinação é diferente dos extratos em acetato de etila pela PC2.

Esses resultados estão descritos no artigo aceito no Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2020.

4.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

O fracionamento dos extratos brutos em éter de petróleo (primavera, verão, outono) e acetato de etila (verão) das raízes de *E. plana*, resultou no isolamento e identificação de 10 diterpenos inéditos. Esses diterpenos fazem parte de uma nova classe denominada neocassano que foi reportada apenas uma vez na literatura (FAVARETTO et al., 2019).

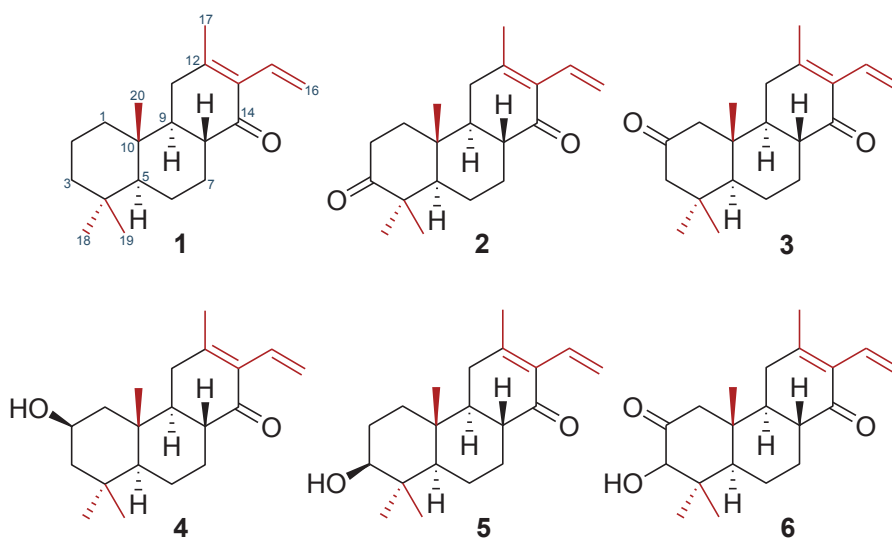
A substância **2** foi isolada em todos os extratos fracionados, enquanto as substâncias **9** e **10** foram isoladas apenas nos extratos em éter de petróleo. A substância **1** foi isolada somente do extrato em éter de petróleo outono e as substâncias **3**, **4**, **5** e **8** foram isoladas apenas do extrato em éter de petróleo verão. Já as substâncias **6** e **7** foram isoladas dos extratos em éter de petróleo (dependendo da estação) e acetato de etila verão.

A discussão sobre a determinação estrutural das substâncias isolados foi dividida, de acordo com a semelhança no esqueleto diterpênico, em duas partes. A primeira parte traz a discussão das substâncias **1-6**, enquanto a segunda parte mostra a discussão das substâncias **7-10**.

4.4.1 Determinação Estrutural Das Substâncias 1-6

As substâncias **1-6** (Figura 23) apresentam uma ligação dupla terminal e quatro grupos metílicos, sendo um grupo metílico ligado a um carbono sp^2 , essas semelhanças são facilmente confirmadas pelo espectro de RMN de 1H .

Figura 23 – Substâncias **1-6** Isoladas dos Extratos Brutos de *E. plana*



A substância **1** foi isolada como um sólido branco e identificada pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D (Tabela 7).

O espectro de RMN de ^1H (APÊNDICE 10, pag. 110) mostrou sinais referentes a quatro grupos metílicos em δ 2,01 (H-17, 3H), 0,86 (H-18, 3H), 0,85 (H-19, 3H) e 0,92 (H-20, 3H). Além de sinais atribuídos a átomos de hidrogênio ligados a carbono sp^2 em δ 6,40 (H-15, 1H) e δ 5,37 e 5,44 (H-16, 2H), cujas constantes de acoplamento (Tabela 7) são características de ligação dupla terminal. Esses átomos de hidrogênio, pelo mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) (APÊNDICE 12, pag. 111), estão ligados aos átomos de carbono em δ 22,30 (C17), δ 33,53 (C18), δ 21,93 (C19), δ 14,38 (C20), δ 130,40 (C15) e δ 119,57 (C16), respectivamente.

A conformação do cicloexano permite que os átomos de hidrogênio assumam posições axial e equatorial, resultando em diferenças nos deslocamentos químicos de dois átomos de hidrogênio ligados no mesmo átomo de carbono. Com isso, cada hidrogênio pode acoplar geminal (^2J) e vicinal (^3J), e como os valores de deslocamentos químicos são muito próximos os sinais acabam se sobrepondo e muitas vezes não é possível definir a multiplicidade, bem como o valor das constantes de acoplamento.

Para a substância **1** as constantes de acoplamento, observadas no espectro de RMN de ^1H , forneceram a configuração relativa em três estereocentros da molécula. Para H-5 (δ_{H} 0,83) e H-8 (δ_{H} 2,16), por exemplo, observou-se constantes referentes a acoplamentos ax-ax (12,0 e 12,0 Hz, respectivamente) e ax-eq (2,5 e 4,5 Hz, respectivamente), sugerindo que tanto H-5 quanto H-8 estão em posição axial. As constantes de acoplamento de H-11ax (δ_{H} 2,24; 11,1 Hz) e H-11eq (δ_{H} 2,26; 5,2 Hz) permitiram definir a posição axial para H-9 (Tabela 7). Constantes com valores entre 8 Hz e 14 Hz são características de acoplamentos axial-axial com ângulo diedro de 180° , se H-5, H-8 e H-9 estivessem em posição equatorial não seria observado nenhum valor maior que 8 Hz (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **1** em CDCl_3

	$\delta ^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta ^{13}\text{C}$	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	0,96, 1H, dd (13,0; 3,7)/1,69 ^a	38,78	3, 5, 9 e 20
2	1,47 ^a /1,57 ^a	18,75	
3	1,15, 1H, dt (13,4; 3,9)/1,41 br dd (13,2;1,6)	41,97	5, 18 e 19
4		33,14	
5	0,83 ^a , dd (12,0; 2,5)	54,30	3, 7, 9, 18, 19 e 20
6	1,30, 1H, dt, (13,1; 3,6)/1,69 ^a	20,93	
7	1,22, 1H, ddd (13,2; 4,0; 1,8)/2,30, 1H, m	27,44	5, 9 e 14
8	2,16 ^a , dt (12,0; 4,5)	44,98	7, 9, 10, 11 e 14
9	1,48 ^a	50,87	1, 5, 7 e 20
10		36,78	
11	2,24, 1H, d (11,1)/2,26, 1H, d (5,2)	32,56	8, 10, 13 e 17
12		155,48	
13		132,12	
14		200,87	
15	6,40, 1H, dd (17,8; 11,5)	130,40	12 e 14
16	5,44, 1H, dd (17,8; 2,1)/5,37, 1H, dd (11,6; 2,1)	119,57	13
17	2,01, 3H, s	22,30	11 e 13
18	0,86, 3H, s	33,53	3, 5 e 19
19	0,85, 3H, s	21,93	3, 5 e 18
20	0,92, 3H, s	14,38	1, 5 e 9

^aSinal sobreposto

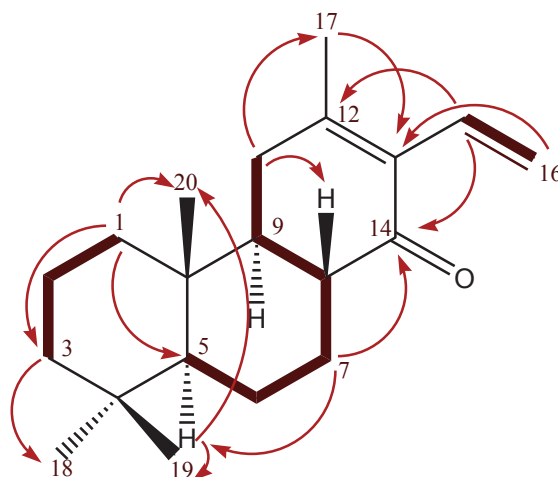
O espectro de RMN de ^{13}C (APÊNDICE 11, pag. 110) mostrou 20 sinais de átomos de carbono, incluindo quatro metílicos, sete metilênicos (um sp^2 em δ_{c} 119,5), quatro metínicos (um sp^2 em δ_{c} 130,4) e cinco átomos de carbono quaternários (uma carbonila em δ_{c} 200,8 e dois sp^2 em δ_{c} 154,3 e δ_{c} 130,4) o que permitiu a proposta de uma estrutura com esqueleto diterpênico.

O mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 13, pag. 111) mostra correlação de H-15 com C-12 e C-14 sugerindo que a carbonila está vicinal ao grupo vinila. Observa-se também correlações de H-17 com C-11 e C-13 o que indica um esqueleto do tipo neocassano. Contudo, o esqueleto neocassano é muito semelhante ao esqueleto cassano, a diferença está na localização do grupo metílico (C-17) que se encontra na posição C-12 nos neocassanos e na posição C-14 nos cassanos (Figura 9, pag. 16), e isso pode ser difícil de identificar.

O experimento de correlação ^1H - ^1H (APÊNDICE 14, pag. 112) ajudou a confirmar os deslocamentos químicos propostos para os átomos de hidrogênio nas posições H-7 e H-11, e depois disso observou-se que os hidrogênios em C-11 correlacionam a longa distância (HMBC) com o carbono metílico C-17 e que os

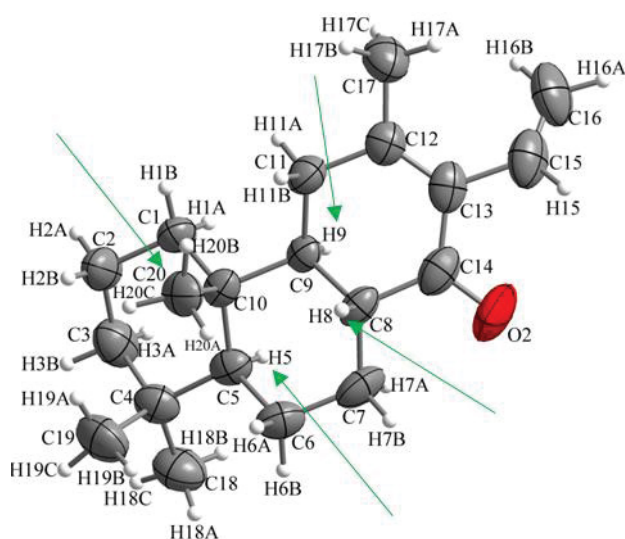
hidrogênios em C-7 correlacionam a três ligações com a carbonila, o que contribuiu na dedução do tipo de esqueleto químico. Esse experimento mostrou também a presença de três sistemas de spin: H-1/H-2/H-3, H-5/H-6/H-7/H-8, H-9/H-11 e H-15/H-16 (Figura 24).

Figura 24 – Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância 1



Com o experimento NOE não foi possível definir a configuração relativa em nenhum estereocentro da molécula devido a proximidade dos deslocamentos químicos de ^1H . Dessa forma, a configuração relativa dos estereocentros bem como, a estrutura química da substância, foram confirmadas pela análise dos dados de DRX obtidos para um monocristal (Figura 25).

Figura 25 – Representação ORTEP da Substância 1



Observa-se que H-5 e H-20, assim como, H-8 e H-9 estão na posição axial, ou seja, as duas junções do anel possuem configuração *trans*, o mesmo se observa para H-9 e H-20 que se encontram *trans* um em relação ao outro (setas verdes).

A configuração absoluta foi determinada por comparação com a estrutura **2**, descrita a seguir, baseando-se na biossíntese dos terpenos. Portanto a substância **1** está denominada como sendo, a (5*S*,8*R*,9*S*,10*R*)-neocassa-12(13),15-dien-14-ona e é inédita na literatura.

As substâncias **2** e **3** foram identificadas pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D. Os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias **2** (Tabela 8) e **3** (Tabela 9) são muito semelhantes aos da substância **1**. As pequenas diferenças observadas nos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , se devem a presença de uma segunda carbonila em C-3 na substância **2** e em C-2 na substância **3**, que foram identificadas no espectro de ^{13}C em δ 216,24 e 210,73, respectivamente.

Para a substância **2** foi possível definir algumas constantes de acoplamento, e com isso definir a configuração relativa de três estereocentros. Para H-5, por exemplo, foram observadas duas constantes de acoplamento, uma ax-ax de 12,0 Hz e a outra ax-eq de 2,6 Hz, com isso foi possível inferir que H-5 está em posição axial, acoplando com H-6ax e H-6eq. Para H-8, observou-se constantes referentes a acoplamentos ax-ax de 11,6 Hz e 13,2 Hz e ax-eq de 4,5 Hz, sugerindo que H-8 está na posição axial, acoplando com H-9ax, H-7ax e H-7eq (Tabela 8).

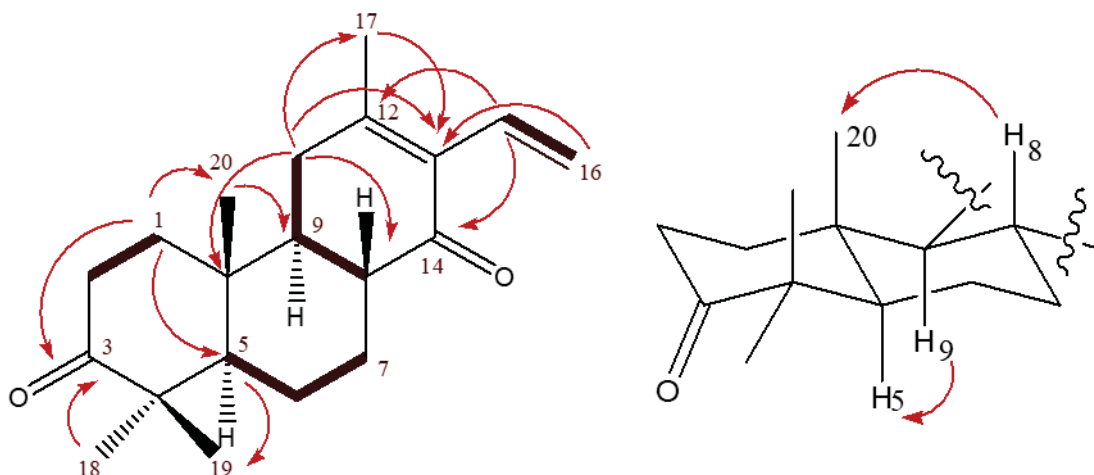
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **2** em CDCl_3 e comparação com a literatura

Nº	$\delta\ ^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$	Favaretto et al, 2019	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	1,48 ^a /2,02 ^a	37,21	154,2	3
2	2,37 ^a /2,65, 1H, ddd (15,4; 13,2; 6,4)	34,35	126,9	3
3		216,24	204,7	
4		47,66	44,6	
5	1,32, 1H, dd (12,0; 2,6)	54,33	51,6	18, 19 e 20
6	1,49 ^a /1,68 ^a	21,76	21,0	
7	1,25, 1H, br ddd (13,4; 4,4; 1,8)/2,39 ^a	27,12	26,9	14
8	2,21, 1H, ddd (13,2; 11,6; 4,5)	44,78	45,2	14
9	1,54 ^a	49,96	46,2	14
10		36,38	38,9	
11	2,31, 2H, br d (7,9)	32,61	32,8	8, 10, 12, 13 e 17
12		154,95	154,2	
13		132,31	132,6	
14		199,83	199,5	
15	6,40, 1H, dd (17,8; 11,7)	130,12	130,1	12 e 14
16	5,46, 1H, dd (17,9; 2,1)/5,39, 1H, dd (11,6; 2,1)	119,92	120,3	13
17	2,04, 3H, s	22,30	22,5	11 e 13
18	1,09, 3H, s	25,90	22,1	3, 5 e 19
19	1,07, 3H, s	21,99	27,1	3, 5 e 18
20	1,11, 3H, s	13,99	16,2	1, 5 e 9

^aSinal sobreposto

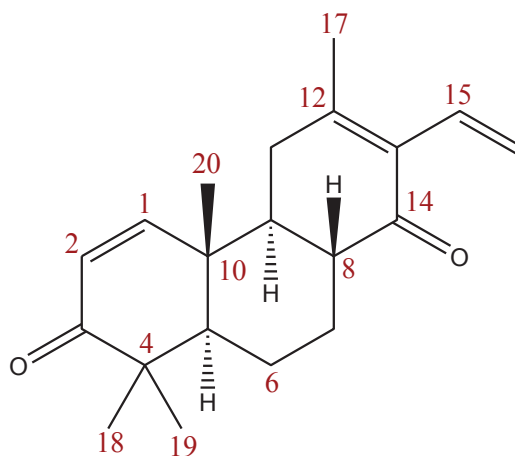
O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 21, pag 115) da substância **2** mostra que dois grupos metílicos (H-18 e H-19) se correlacionam com a carbonila em δ 216,24 e o mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 22, pag 116) mostra que H-2 só apresenta correlação com H-1, indicando a presença de uma carbonila em C-3, ou seja, próxima dos grupos metílicos (Figura 24). Com o experimento NOE (APÊNDICE 23 e 24, pag. 116 e 117) pode-se definir que as duas junções de anel nesta molécula possuem configuração *trans* (Figura 26), pois quando se irradia H-8 observa-se aumento da intensidade do sinal de H-20, da mesma forma, quando se irradia H-5 nota-se aumento da intensidade do sinal de H-9.

Figura 26 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas), COSY (linhas grossas) (esquerda) e NOE (direita) para a Substância **2**



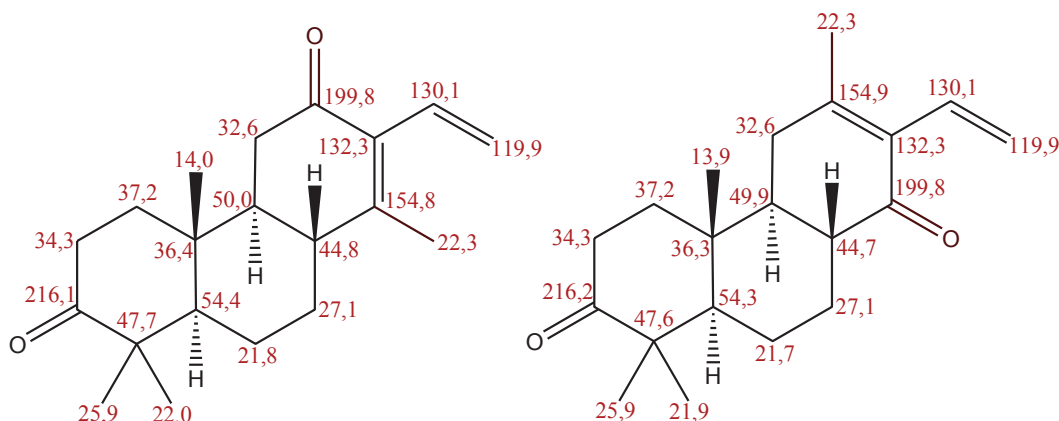
Uma substância muito semelhante foi isolada das raízes de *E. plana* (Favaretto et al, 2019), sendo que a presença de uma insaturação em C-1 é o que diferencia a estrutura proposta por esses autores (Figura 27) da estrutura proposta neste trabalho.

Figura 27 - Diterpeno neocassano já isolado das raízes de *E. plana* com insaturação em C-1



Nishiya e colaboradores (1991) também isolaram um diterpeno das raízes de uma espécie do gênero *Eragrostis* (*Eragrostis ferruginea*) e o que chamou atenção foram os deslocamentos químicos dos átomos de carbono serem iguais aos observados neste trabalho, contudo foi identificado como um diterpeno tipo cassano (Figura 28). A sobreposição total dos sinais e a ausência de análises de raio X e bidimensionais nos leva a pensar que a estrutura proposta por Nishiya e colaboradores (1991) pode ter sido identificada erroneamente.

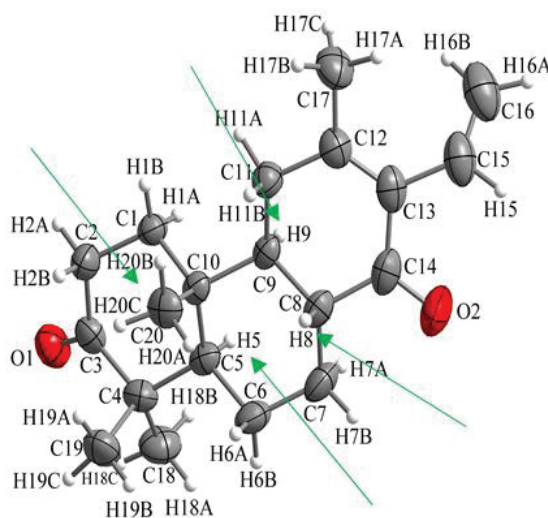
Figura 28 - Estruturas e Deslocamentos Químicos de ^{13}C de Diterpenos cassano (esquerda, já relatado na literatura) e neocassano (direita, apresentado neste trabalho) isolados do gênero *Eragrostis*.



Observa-se que considerando somente os dados de RMN de ^1H e ^{13}C fica difícil diferenciar um esqueleto cassano de um esqueleto neocassano. Sendo assim, uma análise mais detalhada dos experimentos de RMN 2D é muito importante, como foi descrito para a substância **1**. A realização de uma análise de DRX também é muito importante e deve ser feita sempre que for possível obter um monocristal.

A análise de DRX da substância **2**, confirmou novamente um esqueleto do tipo neocassano e mostrou que as junções de anel dessa estrutura apresentam configuração *trans* (Figura 29). Esse resultado facilitou a definição da configuração absoluta dessa substância por Dicroísmo Circular Vibracional (VCD), técnica que vem sendo muito utilizada na definição da configuração absoluta de produtos naturais (REINA et al., 2010; GÓMEZ-HURTADO et al., 2011, BURGUEÑO-TAPIA et al., 2016; ZHU et al., 2018).

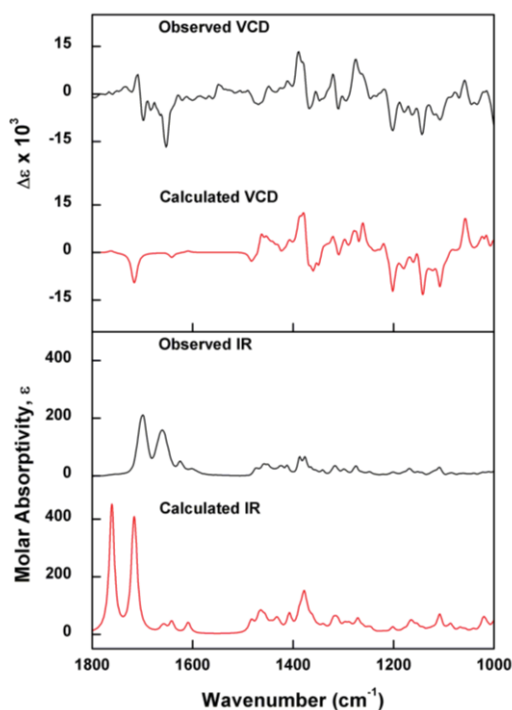
Figura 29 - Representação ORTEP da Substância **2**



A atribuição da configuração absoluta de uma molécula usando VCD envolve a comparação dos espectros experimentais com os espectros calculados de IR e VCD da molécula estudada, considerando o par de enantiômeros (BATISTA JR.; BOLZANI, 2014).

A excelente correlação entre os espectros de IR/VCD observados e simulados (Figura 30) forneceu evidências conclusivas e diretas para a definição da configuração absoluta da substância (+)-**2**, como (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*) e está denominada como sendo, a (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-neocassa-12(13),15-dieno-3,14-diona, inédita na literatura.

Figura 30 - Espectros de VCD e IR Experimentais e Calculados da Substância **2**



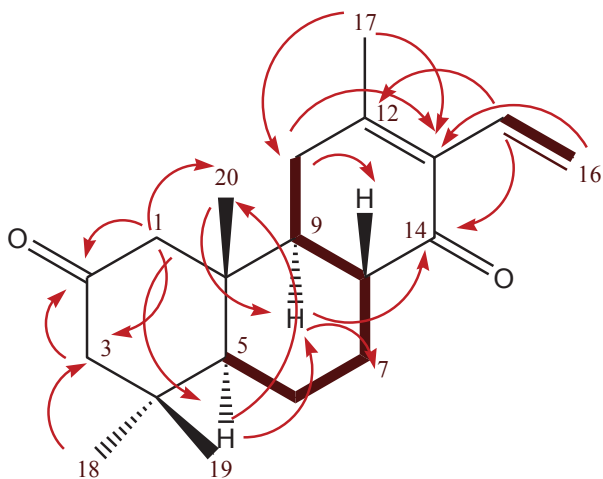
Para a substância **3** também foi possível definir a configuração relativa de três estereocentros através das constantes de acoplamento. Para H-5, por exemplo, foram observadas duas constantes de acoplamento, uma ax-ax de 12,2 Hz e a outra ax-eq de 2,0 Hz, com isso foi possível inferir que H-5 está em posição axial, acoplando com H-6ax e H-6eq. Para H-9, observou-se constantes referentes a acoplamentos ax-ax de 11,8 Hz e 13,1 Hz e ax-eq de 4,6 Hz, sugerindo que H-9 está na posição axial, acoplando com H-8ax, H-11ax e H-11eq (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **3** em CDCl_3

Nº	$\delta\ ^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	2,14 ^a /2,36, 1H, dd (12,3; 2,3)	53,54	2, 3, 5 e 20
2		210,73	
3	2,17 ^a /2,33, 1H, br d (13,2)	56,34	1, 2, 5, 18 e 19
4		39,24	
5	1,44, br dd (12,2; 2,0)	53,79	1, 9, 18, 19 e 20
6	1,40, 1H, dt (12,4; 3,6)/1,84, br m	21,22	8 e 10
7	1,30 ^a /2,41 br m	27,15	9 e 14
8	2,17 ^a	44,83	11 e 13
9	1,75, ddd (13,1; 11,8; 4,6)	50,57	1, 5, 7, 12, 14 e 20
10		42,4	
11	2,17 ^a /2,28, 1H, br d (11,9)	32,34	8, 13 e 17
12		154,82	
13		132,34	
14		199,63	
15	6,40, 1H, dd (17,8; 11,6)	130,09	12 e 14
16	5,40, 1H, dd (11,6; 2,1)/5,45, 1H, dd (17,8; 2,1)	120,00	13
17	2,03, 3H, s	23,26	11 e 13
18	1,07, 3H, s	33,35	3, 5 e 19
19	0,90, 3H, s	22,34	3, 5 e 18
20	0,94, 3H, s	14,91	1, 5 e 9

^aSinal sobreposto

O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 28, pag. 119) da substância **3** mostra que somente H-1 e H-3 correlacionam com a carbonila em δ 210,73 (C-2) e pelo mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 29, pag 120) pode-se confirmar a posição da carbonila entre C-1 e C-3, pois tanto H-1 quanto H-3 não correlacionam com outros átomos de hidrogênio (Figura 31).

Figura 31 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância **3**

Baseado em considerações biossintéticas, pode-se considerar que para **1** e **3** a configuração absoluta em C-5, C-8, C-9 e C-10, seja igual a da substância **2**, exceto pela alteração do estereodescritor em C-5, devido a diferença de prioridade dos ligantes. Sendo portanto a substância **1** denominada como, a (5*S*,8*R*,9*S*,10*R*)-neocassa-12(13),15-dien-14-ona, e a substância **3** como a (5*S*,8*R*,9*S*,10*R*)-neocassa-12(13),15-dieno-2,14-diona, ambas inéditas na literatura.

A substância **4** foi identificada pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D (Tabela 10). O espectro de RMN de ^1H (APÊNDICE 30, pag. 121) mostrou sinais referentes a quatro grupos metílicos em δ 2,03 (H-17, 3H), 1,08 (H-18, 3H), 0,91 (H-19, 3H) e 1,18 (H-20, 3H). Além de sinais atribuídos a átomos de hidrogênio ligados a carbono sp^2 em δ 6,40 (H-15, 1H) e δ 5,38 e 5,45 (H-16, 2H), cujas constantes de acoplamento (Tabela 10) são características de ligação dupla terminal. Esses átomos de hidrogênio, pelo mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) (APÊNDICE 32, pag. 122), estão ligados aos átomos de carbono em δ 22,32 (C17), 24,41 (C18), 33,74 (C19), 16,73 (C20), 130,33 (C15) e 119,67 (C16), respectivamente

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **4** em CDCl_3

Nº	δ ^1H (J em Hz)	δ ^{13}C	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	1,38 ^a /1,85, 1H, ddd (13,9; 5,2; 4,0)	44,79	2, 3, 5 e 20
2	4,19, 1H, q (4,2)	67,74	4 e 10
3	1,45 ^a /1,68, ddd (14,3, 4,8, 1,6)	46,97	1, 2, 5, 18 e 19
4		32,61	
5	0,92 ^a , dd (11; 2,4)	52,90	20
6	1,40 ^a /1,72 ^a	20,94	4, 8 e 10
7	1,22, 1H, ddd (13,3; 4,5; 1,7)/2,33 ^a	27,31	9 e 14
8	2,19, 1H, ddd (13,1; 11,8; 4,6)	44,73	10 e 11
9	1,47 ^a	51,53	20
10		36,37	
11	2,29 ^a	32,71	8, 10 e 17
12		155,48	
13		132,10	
14		200,70	
15	6,40, 1H, dd (17,8; 11,6)	130,33	12 e 14
16	5,38, 1H, dd (11,6; 2,0)/5,45, 1H, dd (17,8; 2,0)	119,67	13
17	2,03, 3H, s	22,32	11 e 13
18	0,91 ^a , s	33,74	3, 5 e 19
19	1,08, 3H, s	24,41	3, 5 e 18
20	1,18, 3H, s	16,73	1, 5 e 9

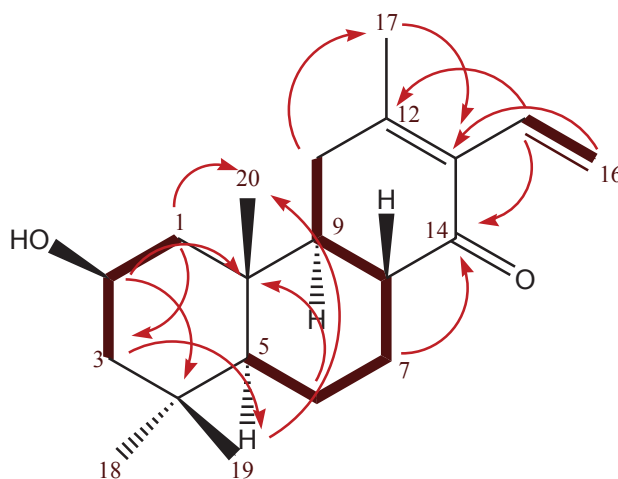
^aSinal sobreposto

Por meio das constantes de acoplamento foi possível definir a configuração relativa de quatro estereocentros. Para H-2 observou-se constante de acoplamento inferior a 8 Hz, o que indica que esse átomo de hidrogênio está em posição equatorial considerando a conformação cadeira. Para H-5 observa-se constantes de acoplamento ax-ax e ax-eq, com isso, pode-se inferir que H-5 está em posição axial acoplando com H6ax e H6eq. Também foi possível verificar a posição axial de H-8 e H-9 por meio das constantes de acoplamento de H-8 (13,1, 11,8 e 4,6 Hz), que sugerem 2 acoplamentos ax-ax (H-7ax e H-9) e 1 acoplamento ax-eq (H-7eq).

O espectro de RMN de ^{13}C (APÊNDICE 31, pag. 121) mostrou 20 sinais de átomos de carbono, incluindo quatro metílicos, seis metilênicos (um sp^2 em δ_c 119,67), cinco metínicos (um sp^2 em δ_c 129 e um carbinólico em δ_c 67,74) e cinco carbonos quaternários (uma carbonila em δ_c 200,70 e dois sp^2 em δ_c 155,48 e δ_c 130,33) o que permitiu a proposta de uma estrutura com esqueleto diterpênico.

O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 33, pag. 122) da substância **4** mostra que o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (δ_H 4,19) apresenta correlação com dois carbonos quaternários C-4 e C-10 e pelo experimento de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 34, pag. 123) observa-se que H-3, assim como, H-1 correlacionam com esse átomo de hidrogênio (δ_H 4,19), o que sugere a posição da hidroxila entre C-1 e C-3 no primeiro anel (Figura 32).

Figura 32 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância **4**



Baseado em considerações biossintéticas, pode-se considerar a configuração absoluta em C-5, C-8, C-9 e C-10 a mesma da substância **2**. A configuração absoluta do C-2 foi proposta de forma indireta, pois, a junção *trans* do anel (C-5 e C-10) fixa a conformação tornando impossível o equilíbrio conformacional entre as conformações cadeira-cadeira, de forma similar como ocorre na *trans*-decalina (CAREY;

SUNDBERG; 2007). Considerando, portanto, que H-2 está em posição equatorial devido a constante de acoplamento de 4,2 Hz, pode-se sugerir a configuração como sendo 2R. Portanto a substância **4** está denominada como sendo, a (2R,5S,8R,9S,10R)-2-hidroxineocassa-12(13),15-dien-14-ona, inédita na literatura.

Os sinais de ^1H e ^{13}C da substância **5** (Tabela 11) são muito semelhantes aos da substância **4**. As pequenas diferenças observadas nos deslocamentos químicos se devem a mudança na posição da hidroxila, que passa a ser em C-3 na substância **5**, e foi identificada no espectro de RMN de ^{13}C em δ 78,85.

Para a substância **5** foi possível definir, por meio das constantes de acoplamento, que H-3, H-5, H-8 e H-9 estão todos em posição axial. Como já mencionado anteriormente, se esses átomos de hidrogênio estivessem em posição equatorial não seria observado nenhuma constante maior que 8 Hz.

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **5** em CDCl_3

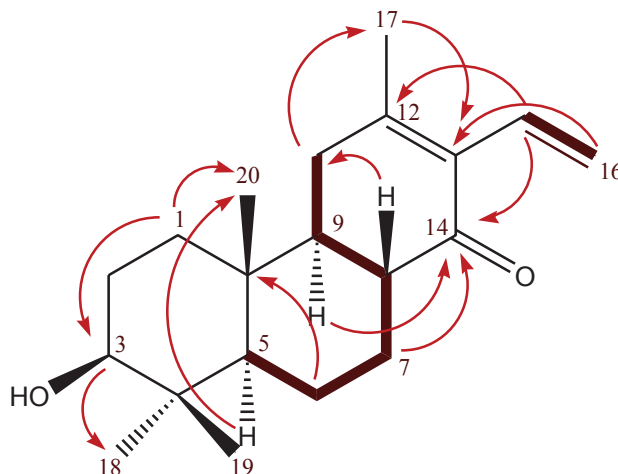
Nº	δ ^1H (J em Hz)	δ ^{13}C	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	1,1, 1H, dt (13,3; 3,5)/1,74 ^a	36,83	3, 9, 20
2	1,60 ^a /1,68, 1H, q (3,8)	27,32	
3	3,23, 1H, dd (11,7; 4,3)	78,85	18 e 19
4		38,83	
5	0,83 ^a , dd (12,6; 2,2)	53,56	20
6	1,36, dq (13,1; 3,8)/1,72 ^a	20,64	10
7	1,21, 1H, ddd (13,3; 4,5; 1,9)/2,34, 1H, br m	27,44	9 e 14
8	2,15, 1H, ddd (13,3; 11,6; 4,6)	44,75	11
9	1,45, 1H, ddd (13,2; 9,7, 6,5)	50,71	1, 7, 14 e 20
10		36,00	
11	2,25, 1H, d (10,3)/2,26, 1H, d (6,2)	32,52	8, 13 e 17
12		155,26	
13		132,30	
14		200,60	
15	6,40, 1H, dd (17,8; 11,6)	130,30	12 e 14
16	5,38, 1H, dd (11,6; 2,1)/5,44, 1H, dd (17,8; 2,1)	119,74	13
17	2,01, 3H, s	22,32	11 e 13
18	0,99, 3H, s	28,24	3, 5 e 19
19	0,82 ^a , s	15,67	3, 5 e 18
20	0,92, 3H, s	14,38	1, 5 e 9

^aSinal sobreposto

O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 38, pag. 125) da substância **5** mostra que o hidrogênio (δ_{H} 3,23) ligado ao carbono carbinólico correlaciona com dois grupos metílicos (H-18 e H-19), assim como, observa-se pelo mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 39, pag. 126) que esse átomo de

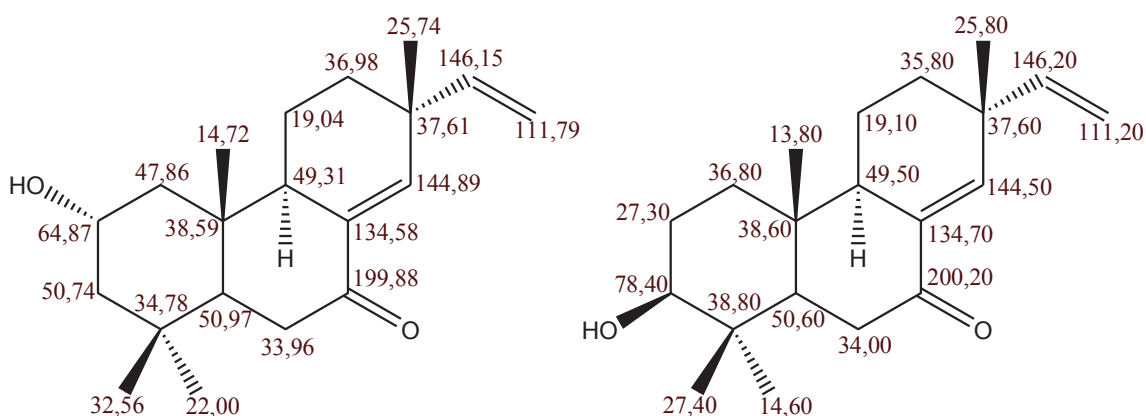
hidrogênio correlaciona apenas com H-2, confirmando que, agora, a hidroxila está próxima dos grupos metílicos no primeiro anel (Figura 33).

Figura 33 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância **5**



No trabalho de Chiplunkar e Nagasampagi (1992) são apresentados dois isopimaranos isolados de *Pulicaria wightiana* que possuem hidroxilas nas posições C-2 ou C-3 (Figura 34). Observa-se que os deslocamentos químicos dos átomos de carbono são muito semelhantes aos deste trabalho, considerando o anel A, uma vez que, a outra parte da estrutura corresponde a outra classe de diterpeno. Observa-se também que a hidroxila em C-2 está em orientação α e a hidroxila em C-3 está em orientação β .

Figura 34 – Estruturas e Deslocamentos Químicos de ^{13}C de Isopimaranos com Hidroxilas nas Posições C-2 ou C-3 Isolados de *Pulicaria wightiana*



Os neocassanos **4** e **5**, mostrados nesse trabalho, apresentam a hidroxila em posição axial e em posição equatorial, respectivamente. Isso foi definido pelo valor das

constantes de acoplamento observadas para cada uma das substâncias e portanto, ambas têm orientação beta.

Baseado em considerações biossintéticas, considerou-se a configuração absoluta em C-5, C-8, C-9 e C-10 a mesma da substância **2**. A configuração absoluta do C-3 foi proposta de forma indireta, pois, a junção *trans* do anel (C-5 e C-10) fixa a conformação, tornando impossível o equilíbrio conformacional entre as conformações cadeira-cadeira, de forma similar como ocorre na *trans*-decalina (CAREY; SUNDBERG; 2007). Considerando que H-3 está em posição axial devido a constante de acoplamento maior que 8 Hz, pode-se sugerir a configuração como sendo 3*S*. Portanto a substância **5** está denominada como sendo, a (3*S*,5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-3-hidroxineocassa-12(13),15-dien-14-ona, inédita na literatura

E, por fim, para a substância **6** os sinais de ^1H e ^{13}C (Tabela 12) também são muito semelhantes aos da substância **1**. As pequenas diferenças observadas nos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C se devem a presença de uma carbonila em C-2 e de uma hidroxila em C-3, que foram identificadas no espectro de ^{13}C em δ 210,19 e em 82,69, respectivamente.

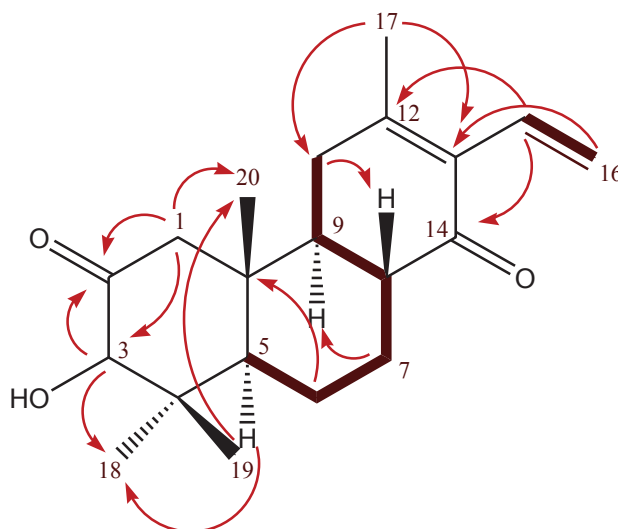
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **6** em CDCl_3

Nº	δ ^1H (J em Hz)	δ ^{13}C	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	2,23, 1H, d (12,2)/2,53, 1H, d (12,2)	50,93	2, 3, 5, 9 e 20
2		210,19	
3	3,93, 1H, br s	82,69	2, 18 e 19
4		45,52	
5	1,52, 1H, dd (12,1; 2,1)	52,84	1, 3, 9, 18, 19 e 20
6	1,45, 1H, dq (12,9; 3,8)/1,86, 1H, br m	20,74	8 e 10
7	1,31 ^a /2,42, 1H, br qd (13,9; 3,9)	27,11	9
8	2,16 ^a	44,72	13
9	1,79, 1H, ddd (13,0; 11,9; 4,5)	50,73	20
10		43,12	
11	2,19 ^a /2,29, 1H, d (11,6)	32,31	8, 10 e 13
12		154,43	
13		132,47	
14		199,28	
15	6,39, 1H, dd (17,8; 11,6)	130,02	12 e 14
16	5,41, 1H, dd (11,6; 2,0)/5,45, 1H, dd (17,8; 2,0)	120,12	13
17	2,03, 3H, s	22,33	11 e 13
18	1,19, 3H, s	29,17	3, 5 e 19
19	0,72, 3H, s	16,60	3, 5 e 18
20	0,91, 3H, s	14,85	1, 5 e 9

^aSinal sobreposto

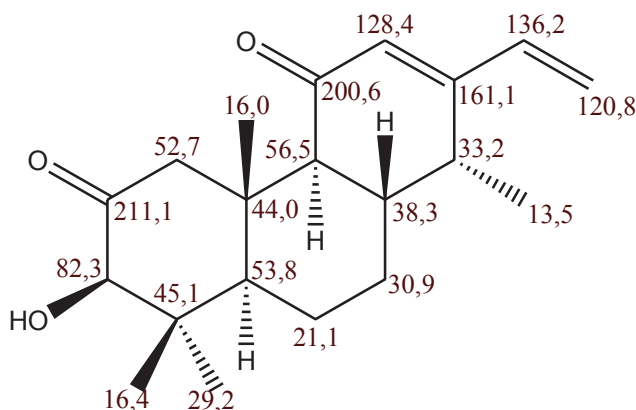
O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 43, pag. 128) da substância **6** mostra que o hidrogênio (δ_{H} 3,93) ligado ao carbono carbinólico correlaciona com as metilas C-18 e C-19, também observa-se que apenas H-1 e H-3 correlacionam com a carbonila (δ_{C} 210,19). O mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 44, pag. 129) confirma a posição da carbonila entre C-1 e C-3, pois tanto H-1 quanto H-3 não correlacionam com outros átomos de hidrogênio (Figura 35).

Figura 35 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância **6**



Uma substância com estrutura semelhante a proposta neste trabalho foi isolada das folhas de *Oryza sativa* L. por Koga e colaboradores (1995), o fitocassano D, que também apresenta uma carbonila na posição C-2 e uma hidroxila na posição C-3 (Figura 36), contudo é um diterpeno do tipo cassano. Os autores ainda sugerem que a presença de grupos hidroxila nas posições C-1, C-2 e C-3 são determinantes na atividade antifúngica dos fitocassanos, isso porque, o fitocassano com grupos hidroxila nessas três posições foi o que apresentou maior atividade.

Figura 36 – Estrutura e Deslocamentos Químicos de ^{13}C do Fitocassano D isolado de *Oryza sativa* L.

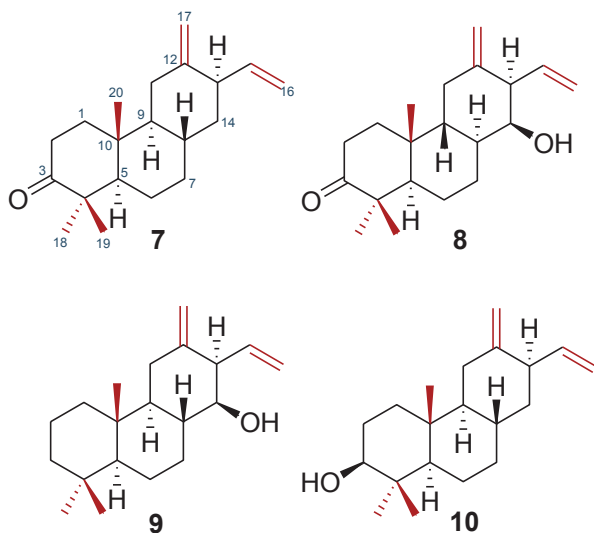


Baseado em considerações biossintéticas, considerou-se a configuração absoluta em C-5, C-8, C-9 e C-10 a mesma da substância **2**, e o estereocentro em C-3, ainda indefinido. Portanto a substância **6** está denominada como sendo, a (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-3-hidroxineocassa-12(13),15-dieno-2,14-diona, inédita na literatura.

4.4.2 Determinação Estrutural Das Substâncias **7-10**

As substâncias **7-10** (Figura 37) são discutidas nessa seção pois todas apresentam duas ligações duplas terminais, sendo uma exocíclica e três grupos metílicos que são facilmente confirmados pelo espectro de RMN de ^1H .

Figura 37 - Substâncias **7-10** Isoladas dos Extratos Brutos de *E. plana*



A substância **7** tem aspecto oleoso e foi identificada pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D (Tabela 13). O espectro de RMN de ^1H (APÊNDICE 48, pag 131) mostrou sinais de átomos de hidrogênio referentes a três grupos metílicos em δ 1,06 (H-18, 3H), 1,05 (H-19, 3H) e 1,01 (H-20, 3H). Foram também observados sinais característicos de dois conjuntos de átomos de hidrogênio ligados a carbono sp^2 , um em 5,04 e 5,02 (H-16, 2H), cujas constantes de acoplamento (Tabela 13) são características de ligação dupla terminal e outro em δ 4,72 e 4,71 (H-17, 2H), correspondentes a uma ligação dupla exocíclica, além de um hidrogênio metínico em δ 5,90 (H-15, 1H). De acordo com o mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) (APÊNDICE 50, pag. 132) esses átomos de hidrogênio estão ligados aos átomos de carbono em δ 25,93 (C-18), 21,90 (C-19), 13,75 (C-20), 114,56 (C-16), 109,13 (C-17) e 141,20 (C-15), respectivamente.

Para essa substância foi possível definir as constantes de acoplamento de H-9 (12,0 e 3,8 Hz), e por meio delas inferir que tanto H-9 quanto H-8 estão em posição axial, ou seja, pode-se considerar que a junção do anel nas posições 8 e 9 é *trans*. Essa configuração relativa foi confirmada pelo experimento NOE (APÊNDICE 53, pag. 133), pois quando se irradia H-9 observa-se aumento da intensidade do sinal correspondente a H-5 e ausência de efeito com H-8, sugerindo que H-5 também está na posição axial (Figura 38).

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **7** em CDCl_3

	$\delta\ ^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	1,44 ^a /2,00 ^a	37,52	3 e 9
2	2,34, 1H, ddd (15,3; 5,4; 3,4)/2,61, 1H, ddd (15,3; 12,9; 6,4)	34,49	1 e 10
3		217,08	
4		47,70	
5	1,32 ^a	55,08	7 e 18
6	1,32 ^a /1,53 ^a	22,47	10
7	0,96 ^a , dt (12,4; 5,0)/1,77 ^a	34,69	
8	1,58 ^a	30,99	
9	0,82, 1H, dt (12,0; 3,8)	56,37	5 e 20
10		36,60	
11	2,00 ^a /2,10, 1H, dd (12,9; 3,8)	30,37	13
12		150,33	
13	3,04 br s	46,45	8, 16 e 17
14	1,28 ^a /1,77 ^a	40,43	9 e 15
15	5,90, 1H, ddd (16,6; 10,7; 5,3)	141,20	12 e 14
16	5,04, 1H, br dt (9,0; 1,6)/5,02, 1H, br dt (17,7; 1,6)	114,56	13
17	4,72, 1H, br d (1,9)/4,71, 1H, br s	109,13	11 e 13
18	1,06, 3H, s	25,93	3
19	1,05, 3H, s	21,90	3
20	1,01, 3H, s	13,75	1 e 5

^aSinal sobreposto

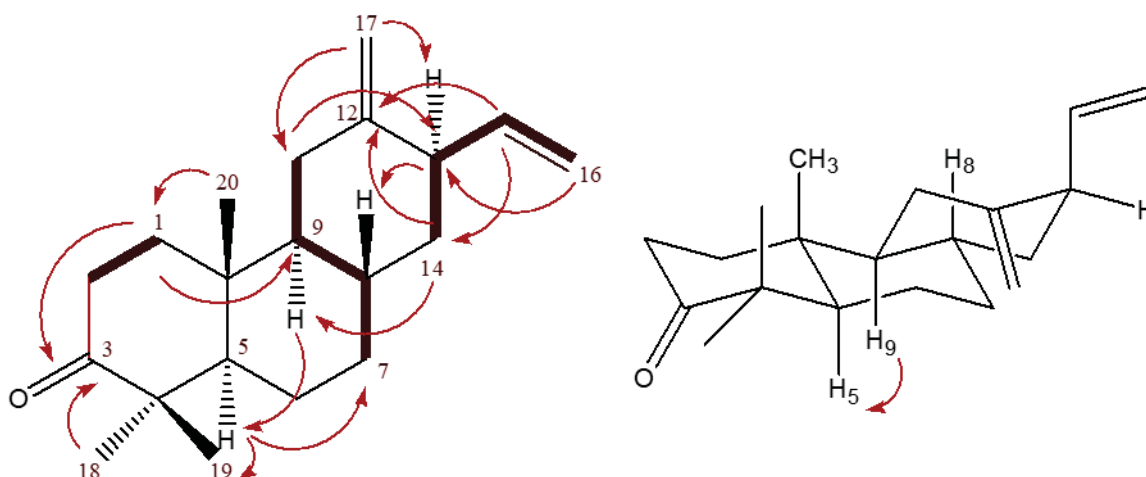
O espectro de RMN de ^{13}C (APÊNDICE 49, pag. 131) mostrou 20 sinais de átomos de carbono incluindo três metílicos, oito metilênicos (dois sp^2 em δ_c 109,13 e 114,56), cinco metínicos (um sp^2 em δ_c 141,20) e quatro carbonos quaternários (uma carbonila em δ_c 217,0 e um sp^2 em δ_c 150,3) o que permitiu a proposta de uma estrutura com esqueleto diterpênico.

O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 51, pag. 132) mostra correlação dos átomos de hidrogênio metilênicos H-17 com C-11/C-13 indicando que a ligação dupla exocíclica está entre esses dois átomos de carbono. Observa-se também que H-13 correlaciona com C-8/C-16/C-17, H-15 com C-12/C-14,

confirmando que as duas ligações duplas (C-12 e C-15) estão próximas. Outra observação importante é a correlação de dois grupos metílicos (H-18 e H-19) com o carbono em 217,0 ppm, sugerindo a posição da carbonila em C-3 (Figura 36).

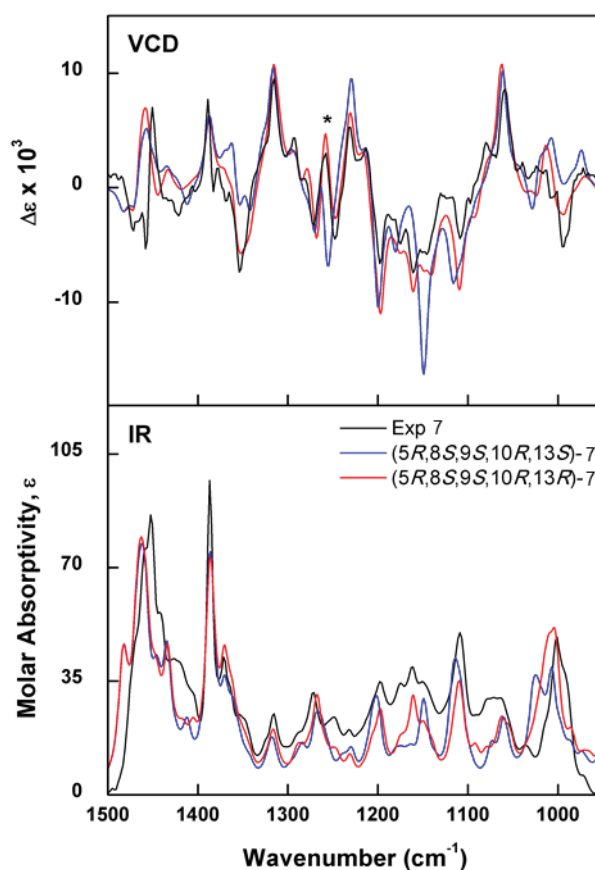
A posição da carbonila em C-3 foi confirmada pelo experimento de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 52, pag. 133) onde verificou-se que H-2 correlaciona apenas com H-1, indicando a presença de um carbono quaternário em C-3 (Figura 38).

Figura 38 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas), COSY (linhas grossas) (esquerda) e NOE (direita) para a Substância **7**



A configuração absoluta da substância **7** foi determinada por dicroísmo circular vibracional (VCD). Os cálculos espectrais de VCD foram realizados para ambos os epímeros possíveis em C-13, ou seja, **7**-(5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*) e **7**-(5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,13*S*). O VCD já se demonstrou uma ferramenta poderosa para distinguir compostos epiméricos quando o RMN leva a conclusões ambíguas (ORTEGA et al., 2019; GIMENES et al., 2019). Como esperado, os espectros de IR e VCD calculados para os epímeros de **7** no carbono C-13 foram muito semelhantes (Figura 39). Uma banda de 1255 cm^{-1} , no entanto, que surge dos modos de deformação $\text{sp}^3\text{-CH}$ e CH_2 envolvendo a maior parte da estrutura molecular, foi assinada de maneira oposta nos epímeros calculados. Apenas os espectros de VCD simulados para o epímero (13*R*) corresponderam ao espectro experimental. Portanto, para substância (+)-**7** foi atribuída a configuração absoluta 5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*, sendo denominada como sendo, a (5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*)-neocassa-12(17),15-dien-3-ona, inédita na literatura.

Figura 39 - Espectros de VCD e IR Experimentais e Calculados da Substância 7



A substância **8** foi identificada pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D (Tabela 14). Os sinais de ^1H e ^{13}C observados para essa substância são muito semelhantes aos da substância **7**. As pequenas diferenças observadas nos deslocamentos químicos se devem a presença de uma hidroxila em C-14 (δ_{H} 3,67; δ_{C} 75,50).

As constantes de acoplamento permitiram definir a configuração relativa de três estereocentros dessa molécula. Pode-se inferir que H-5 está em posição axial acoplando com H-6_{ax} (12,0 Hz) e com H-6_{eq} (2,4 Hz). Assim como, observa-se que tanto H-8 quanto H-9 estão em posição axial devido a constante de acoplamento de 11,9 Hz de H-9.

Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **8** em CDCl_3

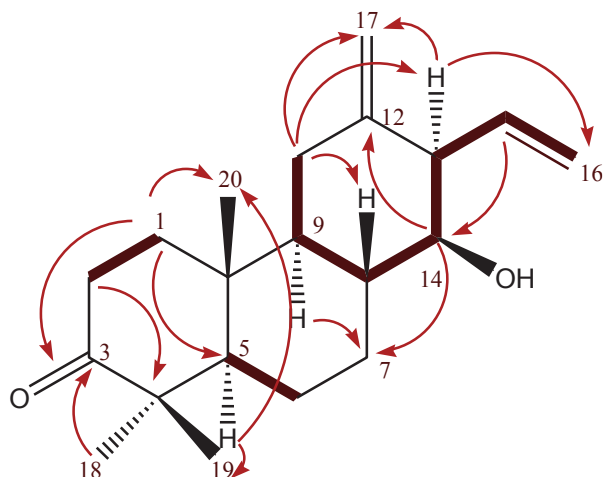
Posição	$\delta\ ^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	Favaretto et al. (2019)	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	1,46 ^a /1,99, 1H, ddd (13,2; 6,3; 3,3)	37,62	115,6	3, 5 e 20
2	2,34, 1H, ddd (15,4; 5,4; 3,4)/2,61, 1H, ddd (15,4; 13,1; 6,4)	34,50	126,2	3 e 4
3		216,79	204,9	
4		47,70	44,5	
5	1,30, 1H, dd (12,0; 2,4)	54,63	51,7	7, 9, 18, 19 e 20
6	1,48 ^a /1,61 ^a	22,31	21,4	
7	1,52 ^a /1,65 ^a	29,64	29,9	
8	1,66 ^a	35,64	36,1	
9	1,21, 1H, dt (11,9; 4,2)	48,85	44,7	1, 7, 12 e 20
10		36,51	38,9	
11	2,04, br t (13,0)/2,12, 1H, dd (13,1; 4,2)	29,91	29,5	8, 13 e 17
12		146,22	145,5	
13	3,08, 1H, br s	55,31	55,1	8, 11, 16 e 17
14	3,67, 1H, br s	75,50	75,5	7, 9 e 12
15	5,85, 1H, ddd (16,3; 10,4; 5,6)	136,94	136,8	12 e 14
16	5,11, 1H, br d (17,6; 1,6)/5,14, 1H, br d (10,7; 1,6)	116,58	116,8	13
17	4,88, br s/4,96, br s	113,83	114,3	11 e 13
18	1,07, 3H, s	25,94	22,0	3, 5 e 19
19	1,05, 3H, s	21,99	27,1	3, 5 e 18
20	1,02, 3H, s	13,66	15,7	1, 5 e 9

^aSinal sobreposto

Favaretto e colaboradores (2019) isolaram um diterpeno muito semelhante das raízes de *E. plana*, sendo que a presença de uma insaturação em C-1 diferenciou a estrutura proposta por esses autores da estrutura apresentada nesse trabalho.

O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 57, pag. 135) mostra correlação de dois grupos metílicos (H-18 e H-19) com o carbono em 216,97 ppm, sugerindo novamente a posição da carbonila em C-3, como na substância **7**. Pode-se observar que o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico correlaciona com um átomo de carbono sp^2 (C-12), indicando que a hidroxila está próxima da ligação dupla exocíclica. Além disso, o mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 58, pag. 136) mostra que o hidrogênio metínico H-13 correlaciona com H-14 e H-15, sugerindo que a hidroxila está vicinal ao grupo vinila (Figura 40).

Figura 40 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas) e COSY (linhas grossas) para a Substância **8**



Baseado em considerações biossintéticas, considerou-se a configuração absoluta em C-5, C-8, C-9, C-10 e C-13 a mesma da substância **7**, e o estereocentro em C-14, baseado na estrutura **9** descrita a seguir. Portanto a substância **8** está denominada como sendo, a (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*)-14-hidroxineocassa-12(17),15-dien-3-ona, inédita na literatura.

Os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **9** (Tabela 15), isolada com aparência oleosa, são muito semelhantes aos da substância **8**. As pequenas diferenças observadas nos deslocamentos químicos se devem a ausência de uma carbonila em C-3.

Para a substância **9** foi possível definir a configuração relativa em dois estereocentros da molécula. Embora o sinal de H-5 esteja sobreposto é possível definir que se trata de um duplo duplete com uma constante maior que 10,0 Hz, sugerindo que H-5 está na posição axial acoplado com H-6_{ax} e outra constante característica de acoplamento axial-equatorial com H-6_{eq} (2,1 Hz). As constantes de acoplamento de H-11_{ax} (δ_{H} 1,97; J_{aa} 12,7 Hz) e H-11_{eq} (δ_{H} 2,11; 13,1_g e J_{ae} 4,2 Hz) permitiram definir a posição axial para H-9 (Tabela 15).

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **9** em CDCl_3

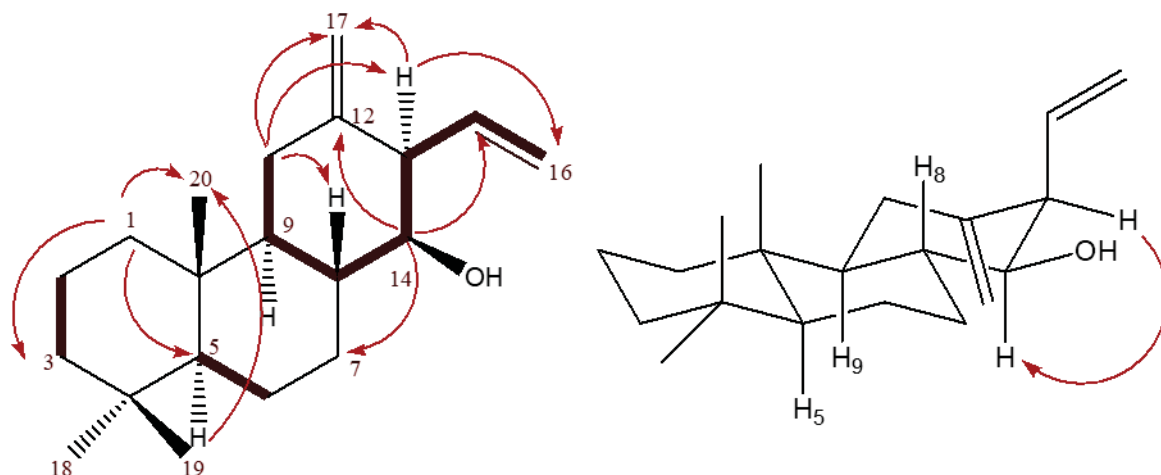
Posição	$\delta\ ^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	0,93, 1H, dt (13,0; 3,1)/1,65 ^a	39,08	3, 5 e 20
2	1,44 ^a /1,54 ^a	18,81	
3	1,14 ^a /1,38 ^a	42,09	2 e 5
4		33,19	
5	0,81 ^a dd (<10; 2,1) sobreposto	54,62	1 e 20
6	1,30 dt (12,8; 3,9)/1,61 ^a	21,38	8 e 10
7	1,49 br dt (11,2; 3,0)/1,59 ^a	29,97	
8	1,63 ^a	35,65	
9	1,12 ^a	49,82	
10		36,87	
11	1,97, 1H, br t (12,7)/2,11, 1H, dd (13,1; 4,2)	29,67	8, 9, 12, 13, e 17
12		147,06	
13	3,05 1H, br s	55,38	8, 11, 14, 16 e 17
14	3,61, 1H, br s	75,90	7, 9, 12 e 15
15	5,85, 1H, ddd (16,7; 10,7; 5,86)	137,22	12 e 14
16	5,09, 1H, br dt (18,4; 1,6)/5,10, 1H, br dt (9,2; 1,6)	116,26	13
17	4,84, 1H, br s/4,92, 1H, br t (2,0)	113,21	11 e 13
18	0,84 ^a s	33,55	19
19	0,83, 3H, s	21,91	3, 5 e 18
20	0,84 ^a s	13,98	1, 5 e 9

^aSinal sobreposto

Pelo experimento de NOE (APÊNDICE 67, pag. 140) foi possível definir a configuração relativa em alguns estereocentros da molécula, por exemplo, observou-se que H-13 e H-14 estão *cis*, pois foi possível verificar o efeito NOE entre esses átomos de hidrogênio. Quando se irradia H-9, observa-se ausência de efeito com hidrogênio em 1,63 ppm (H-8) o que nos leva a inferir que a junção do anel em C-8 e C-9 é *trans*. (Figura 41).

O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 64, pag. 139) mostra que o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (H-14) se correlaciona com dois átomos de carbono sp^2 (147,06 e 137,22), indicando que a hidroxila está a três ligações tanto do grupo vinila (C-15) como da ligação dupla exocíclica (C-12). O mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 66, pag. 140) confirma a posição da hidroxila vicinal ao grupo vinila devido a existência de correlação entre H-13 e H-14/H-15 (Figura 41).

Figura 41 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas), COSY (linhas grossas) (esquerda) e NOE (direita) para a Substância **9**



Baseado em considerações biossintéticas, considerou-se a configuração absoluta em C-5, C-8, C-9, C-10 e C-13 a mesma da substância **7**. A configuração absoluta do C-14 foi proposta de forma indireta, considerando que H-14 está *cis* ao H-13 pelo experimento NOE, e a configuração do C-13 foi definida pela técnica VCD na substância **7**. Portanto a substância **9** está denominada como sendo, a (5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*)-14-hidroxineocassa-12(17),15-dieno, inédita na literatura.

A substância **10** foi isolada como um sólido branco e apresenta sinais de RMN de ¹H e ¹³C muito semelhantes aos da substância **7**, sendo que, as diferenças observadas nos deslocamentos químicos se devem a presença de um grupo hidroxila ao invés da carbonila na posição C-3.

Para a substância **10** foi possível definir a configuração relativa de três estereocentros por meio das constantes de acoplamento de H-3 e H-9. Para H-3 as constantes indicam que este átomo de hidrogênio está em posição axial acoplado axial-axial (11,6 Hz) com H-2_{ax} e axial-equatorial (4,5 Hz) com H-2_{eq}. Para H-9 as constantes de 11,4 e 12,4 Hz sugerem acoplamento axial-axial com H-8 e H-11_{ax} e a constante de 3,9 Hz corresponde a acoplamento axial-equatorial com H-11_{eq}, indicando que tanto H-9 quanto H-8 estão em posição axial, ou seja, a junção de anel nesta parte da molécula é *trans* (Tabela 16).

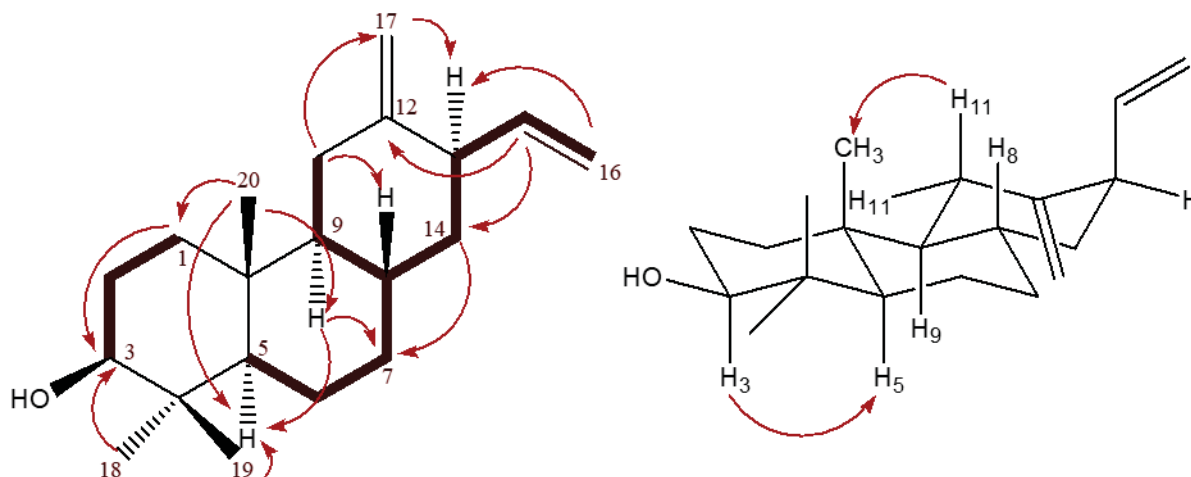
Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC obtidos para a Substância **10** em CDCl_3

	$\delta\ ^1\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$	HMBC
1	1,07, 1H, dd (13,2; 4,1)/1,72 ^a	36,98	3 e 9
2	1,56 ^a /1,64 ^a	27,47	
3	3,21, 1H, dd (11,6; 4,5)	79,08	1, 18 e 19
4		38,90	
5	0,82 ^a	54,35	
6	1,36 dt (12,9; 3,7)/1,59 ^a	21,29	
7	0,90 ^a /1,72 ^a	35,13	
8	1,52 ^a	30,84	
9	0,73, 1H, ddd (12,4; 11,4; 3,9)	57,17	5, 7 e 20
10		36,79	
11	1,92, br t (12,7)/2,07 dd (12,9; 3,9)	30,15	8, 13 e 17
12		151,01	
13	3,01 br s	46,63	8, 16 e 17
14	1,23 ^a /1,75 ^a	40,73	7, 9 e 15
15	5,90 ddd (16,5; 11,3; 5,4)	141,39	12 e 14
16	5,01 ^a , 1H, dd (17,3; 1,8)/5,02 ^a , 1H, dd (10,2; 1,8)	114,36	13
17	4,68, 1H, br s/4,69, 1H, br s	108,71	11 e 13
18	0,96, 3H, s	28,25	3, 5 e 19
19	0,80, 3H, s	15,61	3, 5 e 18
20	0,83, 3H, s	14,11	1, 5 e 9

O experimento de NOE (APÊNDICE 76 E 77, pag. 144 e 145) também colaborou para definir a configuração relativa, pois quando se irradia H-3 ocorre aumento da intensidade do sinal de H-5, e pela constante de acoplamento definiu-se que H-3 está na posição axial, dessa forma, pode-se inferir que H-5 também está na posição axial. Da mesma forma, quando se irradia H-11ax (δ_{H} 1,92) observa-se aumento da intensidade do sinal de H-20, sendo assim, como H-9 e H-11ax estão *trans* um em relação ao outro, podendo-se inferir que H-9 está *trans* em relação a H-20 (Figura 42).

O experimento a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) (APÊNDICE 74, pag. 143) mostra que dois grupos metílicos (H-18 e H-19) e H-1 se relacionam com o carbono em 79,08 ppm, sugerindo a posição da hidroxila em C-3, isso é confirmado pelo mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) (APÊNDICE 75, pag. 144), no qual o hidrogênio (H-3, δ_{H} 3,21) ligado ao carbono carbinólico, assim como H-1 se correlacionam com H-2 (Figura 42).

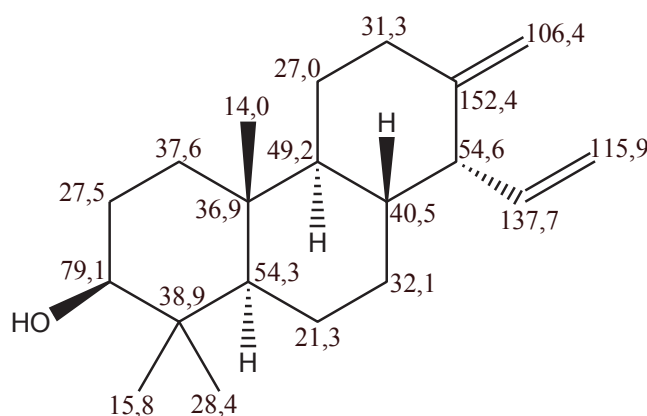
Figura 42 - Principais Correlações Observadas pelos Experimentos de HMBC (setas), COSY (linhas grossas) (esquerda) e NOE (direita) para a Substância **10**



Baseado em considerações biossintéticas, considerou-se a configuração absoluta em C-5, C-8, C-9, C-10 e C-13 a mesma da substância **7**. A configuração absoluta do C-3 foi proposta de forma indireta, considerando que H-3 está *cis* ao H-5 pelo experimento NOE, e a configuração de C-5 foi definida pela técnica VCD na substância **7**. Portanto a substância **10** está denominada como sendo, a (3*S*,5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*)-3-hidroxineocassa-12(17),15-dieno, inédita na literatura.

Roengsumran e colaboradores (2009) isolaram um diterpeno com os deslocamentos químicos dos átomos de carbono muito semelhantes aos deste trabalho, contudo, trata-se de outra classe de diterpenos, os cleistantanos (Figura 43).

Figura 43 – Estrutura e Deslocamentos Químicos de ¹³C de Diterpeno Cleistantano Isolado do Caule de *Croton oblongifolius*



Outras classes de diterpenos também foram isoladas do gênero *Eragrostis*, Sebastião et al, (2010; 2012), isolaram diterpenos do tipo norlabdano e labdano dos

extratos das partes aéreas de *E. viscosa*. Nishiya et al, (1991), isolaram diterpenos do tipo pimarano e cassano, obtidos da fração hexânica das raízes de *E. ferruginea*.

A presença de diterpenos nos extratos de *E. plana* pode estar associada a atividade alelopática observada nesses extratos. Algumas pesquisas sugerem que fatores bióticos e abióticos podem aumentar a produção de diterpenos em algumas espécies e com isso influenciar nos mecanismos de defesa da planta (KATO-NOGUCHI; KOBAYASHI, 2009; MAFU et al, 2018). No arroz, por exemplo, a radiação UV pode aumentar a produção de momilactona, um diterpeno com potencial ação alelopática (KATO-NOGUCHI; KUJIME; INO, 2007; KATO-NOGUCHI; PETERS, 2013).

Segundo WEI et al. (2019), os diterpenos fitotóxicos desempenham um papel importante nas interações planta-planta e planta-microrganismo, o que pode inibir ou promover a germinação de sementes e o crescimento de plântulas ou causar sintomas de doença no organismo da planta alvo.

4.5 TESTES ALELOPÁTICOS COM AS SUBSTÂNCIAS PURAS

As variáveis dependentes testadas nos bioensaios foram: comprimento da radícula (CR), comprimento da parte aérea (CPA), porcentagem de germinação (PG), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG). Os fatores considerados nestes experimentos foram: Substância, Espécie Receptora e Concentração. O conjunto de dados no delineamento experimental foi analisado por modelos lineares generalizados (MLG). Os dados das variáveis CPA, CR e PG foram ajustados à distribuição gama com função de ligação log e as variáveis TMG e IVG, foram ajustadas à distribuição normal. Nesta discussão estão sendo analisados somente os fatores principais e as interações que apresentaram diferenças estatísticas significativas, ao intervalo de confiança de 95% (Tabela 17).

Tabela 17 - Fatores que Resultaram em Diferenças Estatísticas Significativas para as Variáveis Dependentes de Crescimento (CR e CPA) e de Germinação (IVG)

Fatores	Teste Qui-quadrado de Wald	Graus de liberdade	p-valor
CR			
Substância	1325,016	3	0,000
Concentração	193,698	3	0,000
Substância*Espécie Receptora	28,725	3	0,000
Substância*Concentração	472,161	9	0,000
CPA			
Substância	280,005	3	0,000
Concentração	63,806	3	0,000
Substância*Espécie Receptora	60,786	3	0,000
Substância*Concentração	113,202	9	0,000
IVG			
Substância	7,885	3	0,040

CR = Comprimento da Radícula; CPA = Comprimento da Parte Aérea; IVG = Índice de Velocidade de Germinação.

O modelo linear generalizado para o CPA (Equação 6) e CR (Equação 7) apresentou uma medida de ajuste AIC (Akaike Information Criterion) igual a 236,19 e 283,06, respectivamente.

$$\hat{y} = e^{1,710 - 0,730 * glif * Eh - 0,094 * subst9 * Eh - 0,154 * subst10 * Eh - 1,066 * glif * C333,3 - 1,197 * glif * C666,6 - 0,902 * glif * C166,6 - 0,249 * subst10 * C333,3 - 0,314 * subst10 * C666,6 - 0,085 * subst10 * C166,6}$$

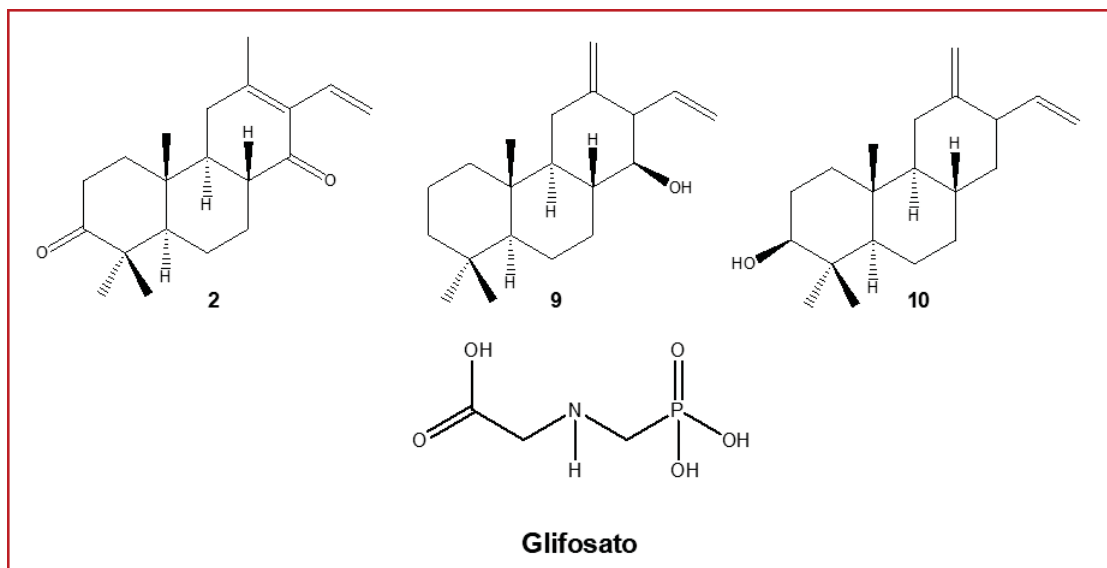
Equação 6

$$\hat{y} = e^{1,938 + 0,313 * subst10 * Eh - 2,577 * glif * C333,3 - 2,725 * glif * C666,6 - 2,600 * glif * C166,6 + 0,280 * Subst9 * C333,3 + 0,382 * subst9 * C666,6 + 0,035 * subst9 * C166,6 - 0,322 * subst10 * C333,3 - 0,286 * subst10 * C666,6 - 0,162 * subst10 * C166,6}$$

Equação 7

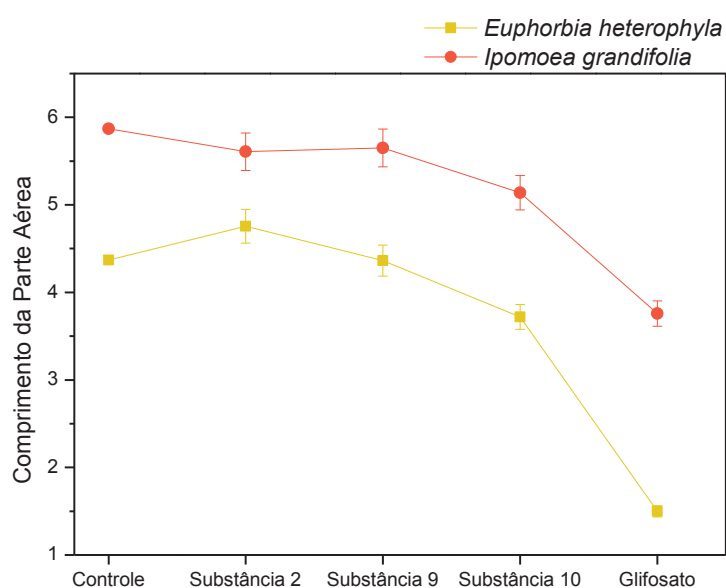
Foi avaliado o potencial fitotóxico de três substâncias isoladas das raízes de *E. plana* e do herbicida glifosato (Figura 44) frente a duas espécies daninhas, *I. grandifolia* e *E. heterophylla*.

Figura 44 – Estrutura Química das Substâncias Isoladas das Raízes de *E. plana* (**2**, **9** e **10**) e do Herbicida Glifosato



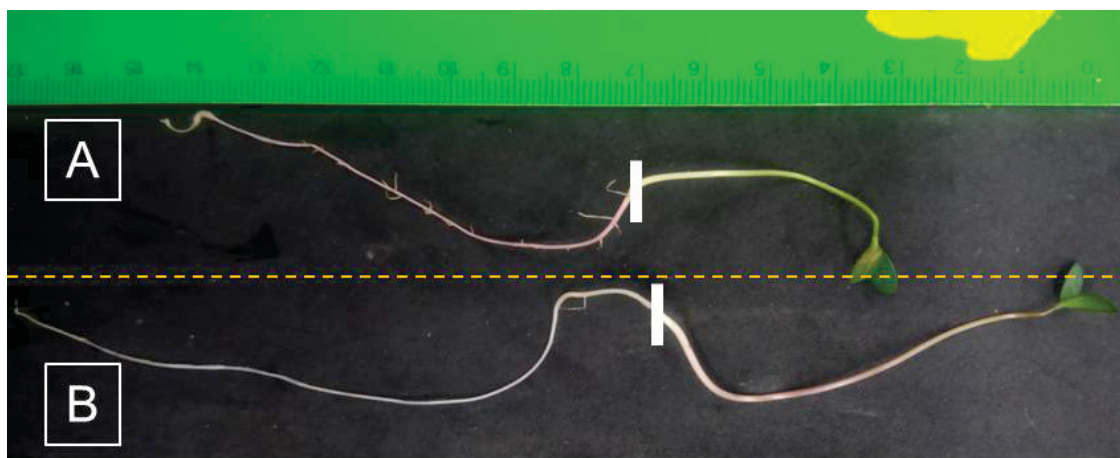
Para a variável CPA, a análise de interação Substância vs. Espécie Receptora mostrou que na *E. heterophylla*, a substância **10** provocou redução nos valores de CPA, sendo estatisticamente diferente dos valores obtidos com a substância **2**, enquanto para a *I. grandifolia* as três substâncias resultaram em valores de CPA estatisticamente iguais. Já o glifosato resultou nos menores valores de CPA para ambas as espécies receptoras (Figura 45).

Figura 45 - Interação Substância vs. Espécie Receptora para a Variável Comprimento da Parte Aérea (CPA)



Foi possível observar que a substância **10** afetou negativamente o CPA de *E. heterophylla*, a figura 46 mostra uma plântula de *E. heterophylla* retirada da placa do controle (B) e uma plântula da mesma espécie retirada da placa com a substância **10** (A). Sugere-se que após a perturbação inicial causada pela substância alelopática, a planta receptora tem que realocar recursos para se defender, em vez de investir no crescimento, com isso, a taxa de crescimento geral é prejudicada (GHATAK et al., 2018; SCOGNAMIGLIO; SCHNEIDER, 2020)

Figura 46 - Plântula de *E. heterophylla* retirada da placa com a substância **10** (A) e da placa controle (B)

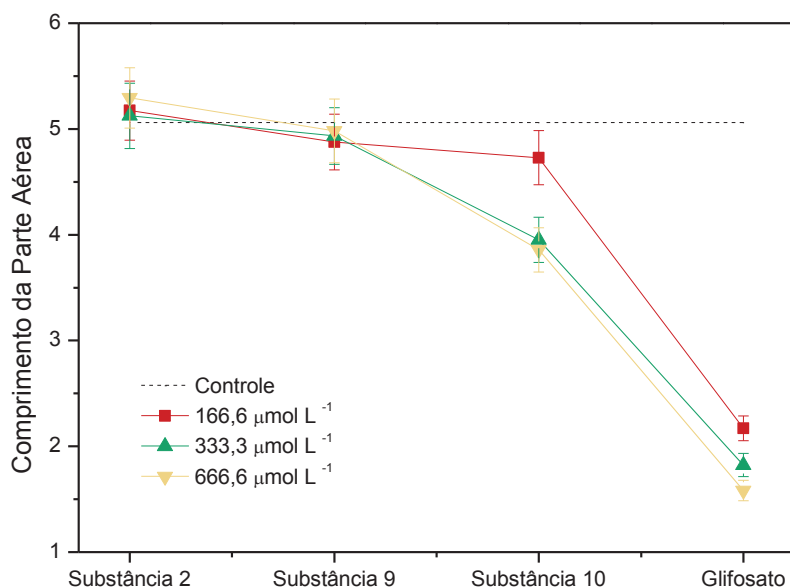


Notou-se diferenças nos valores de CPA quando comparadas as duas espécies receptoras. Segundo a equação do modelo (Equação 6), as substâncias **9**, **10** e o glifosato apresentam 9%, 14% e 52% menos chances de apresentarem maiores valores de CPA quando aplicados na *E. heterophylla*, se comparados com a *I. grandifolia*, respectivamente.

Resultado semelhante pode ser observado no trabalho de Ferreira et al. (2017) onde a atividade fitotóxica de alguns diterpenos, isolados de *Vellozia gigantea*, foi maior ou menor dependendo da espécie alvo e da concentração testada.

A análise da interação Substância vs. Concentração mostrou que, a substância **10**, nas concentrações de 333,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 666,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, resultou em valores de CPA menores que o controle. Para as substâncias **2** e **9** os valores dessa variável não se alteraram em função da concentração testada e foram estatisticamente iguais ao controle. Já o glifosato apresentou valores de CPA estatisticamente menores que o controle, em todas as concentrações testadas (Figura 47).

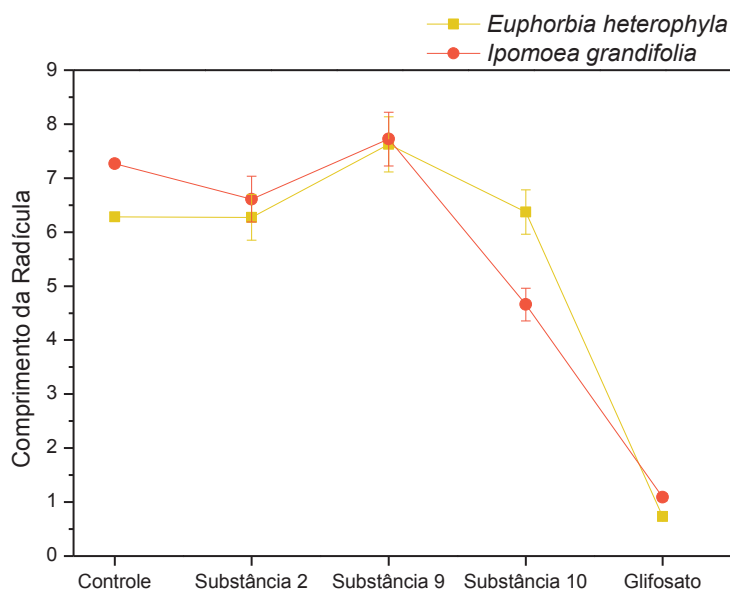
Figura 47 - Interação Substância vs. Concentração para a Variável Comprimento da Parte Aérea (CPA)



A equação do modelo (Equação 6) mostrou que para a substância **10**, as concentrações de $166,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $333,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $666,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram 8%, 22% e 27% menos chances de resultarem em valores de CPA maiores que o controle, respectivamente. Para o glifosato as concentrações de $166,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $333,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $666,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram 59%, 66% e 70% menos chances de resultarem em valores de CPA maiores que o controle, respectivamente.

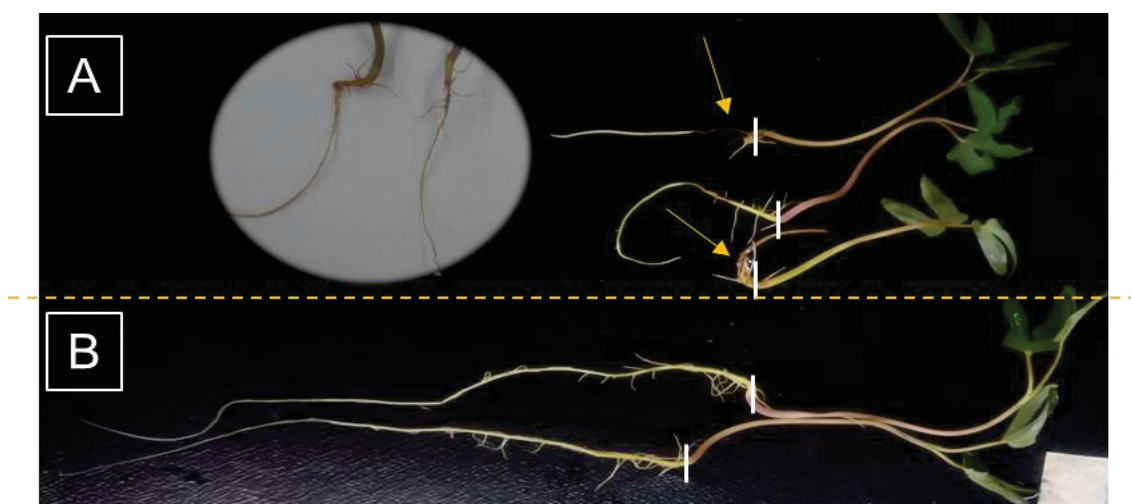
Considerando o CR, a análise da interação Substância vs. Espécie Receptora mostrou que, os valores de CR de *I. grandifolia* obtidos com a aplicação da substância **10**, foram estatisticamente menores que os valores obtidos com as substâncias **2** e **9**. Enquanto para a *E. heterophylla* não se observaram diferenças estatísticas nos valores de CR obtidos com as substâncias **2**, **9** e **10**. O glifosato resultou nos menores valores de CR para ambas as espécies receptoras (Figura 48).

Figura 48 - Interação Substância vs. Espécie Receptora para a Variável Comprimento da Radícula (CR)



Foi possível observar que a substância **10** afetou negativamente o CR de *I. grandifolia*, a figura abaixo mostra plântulas de *I. grandifolia* da placa do controle (B) e plântulas da mesma espécie retiradas da placa com a substância **10** (A) (Figura 49). Nota-se que além de reduzir o tamanho da radícula, essa substância causou necrose e deformidades na radícula.

Figura 49 - Plântulas de *I. grandifolia* Retiradas da Placa com a Substância **10** e Ampliação de Radículas com Necrose e Deformidades (A) e Plântulas da placa Controle (B)

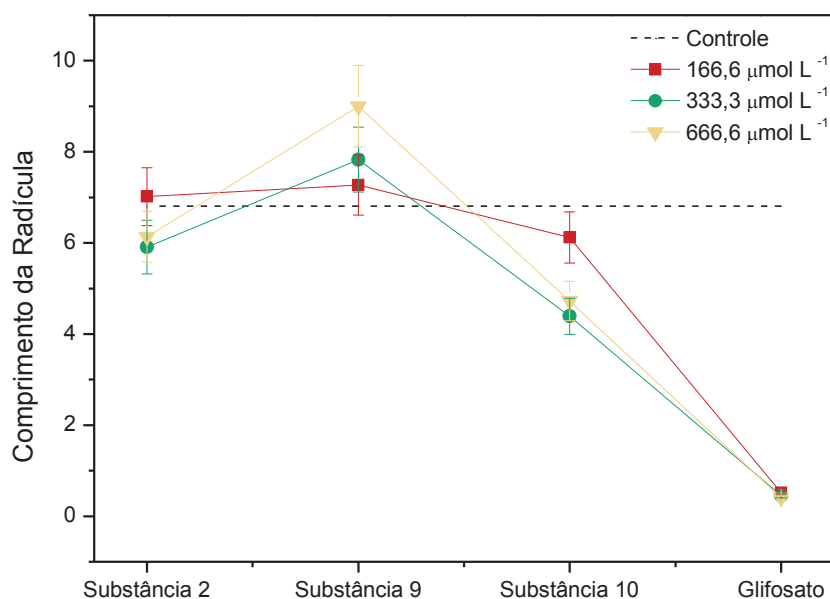


As setas indicam pontos de necrose e deformidades

A equação do modelo (Equação 7) mostrou que, a substância **10** aplicada na *E. heterophylla*, possui 37% mais chances de resultar em valores de CR maiores, do que quando aplicada na *I. grandifolia*.

A análise da interação Substância vs. Concentração mostrou que a substância **10**, nas concentrações de $333,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $666,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, resultou em valores de CR estatisticamente menores que o controle. Notou-se também, que os valores de CR obtidos com o glifosato, em todas as concentrações testadas, são estatisticamente menores que o controle (Figura 50).

Figura 50 - Interação Substância vs. Concentração para a Variável Comprimento da Radícula (CR)



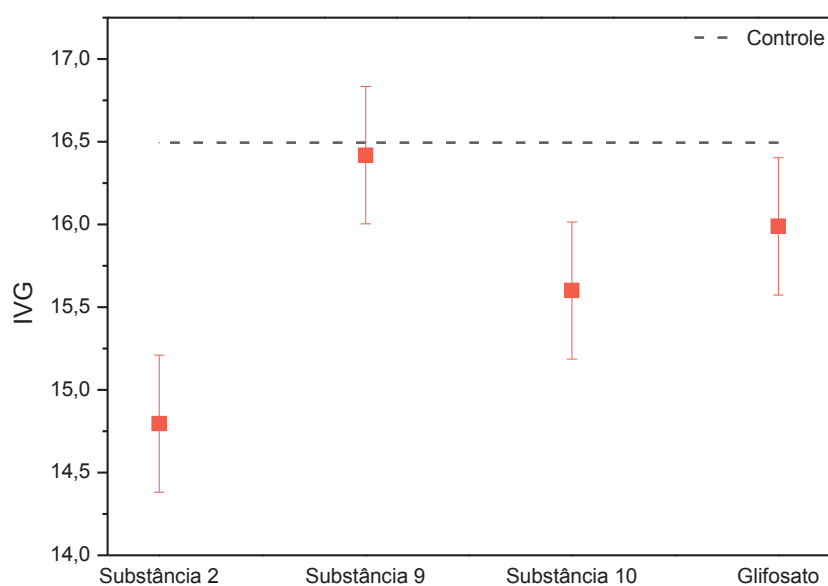
A equação do modelo (Equação 7) nos mostrou que a substância **10**, nas concentrações de $166,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $333,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $666,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentou 15%, 28% e 25% menos chances de resultar em valores de CR maiores que o controle, respectivamente. Por outro lado, a substância **9** estimulou o CR, observou-se que nas concentrações de $166,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $333,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $666,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, ela apresentou 4%, 32% e 47% mais chances de resultar em CR maiores que o controle, respectivamente. Já o glifosato, nas mesmas concentrações, possui aproximadamente 92% menos chances de resultar em valores de CR maiores que o controle.

O herbicida glifosato resultou nos menores valores das variáveis de crescimento (CR e CPA) para ambas as espécies receptoras. Esse herbicida possui amplo espectro de ação e alto grau de fitotoxicidade em espécies daninhas, sendo considerado o herbicida com maior impacto na agricultura neste século (DUKE e POLWES, 2008). As plantas de *E. heterophylla* e *I. grandifolia* são consideradas tolerantes ao glifosato (VARGAS et al., 2013; PAZUCH et al., 2017) quando ele é aplicado em estágios mais avançados de desenvolvimento, no entanto, no estágio de

plântulas, como ocorreu no presente ensaio, há menos barreiras até o herbicida atingir o local de ação (enzima EPSPs) e, portanto, sua eficiência é maior.

Com relação ao IVG, pode-se observar que a substância **2** afetou negativamente essa variável, resultando em valores estatisticamente menores que os obtidos com a substância **9**. Nota-se que os valores de IVG obtidos com a substância **2**, embora não sejam estatisticamente diferentes, foram menores que os valores obtidos com o herbicida glifosato (Figura 51).

Figura 51 – Índice de Velocidade de Germinação em função da Substância testada



A substância **9**, nas concentrações de $166,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $333,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $666,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, não afetou negativamente as espécies testadas, mas poderia ser ativa em outras concentrações ou com outras espécies receptoras. Neste trabalho, a porcentagem de germinação e o tempo médio de germinação, das sementes tratadas com as substâncias **2**, **9**, **10** e o herbicida glifosato, foram semelhantes ao controle. Em outro estudo, o glifosato afetou negativamente e positivamente a porcentagem de germinação, dependendo da espécie testada, confirmando que as diferenças nas etapas de germinação, a quantidade de reservas de energia para o desenvolvimento de plântulas e os requisitos de nutrientes são específicos para cada espécie (HELANDER et al., 2019).

As substâncias testadas estão dentro da faixa de valores encontrados para os herbicidas comerciais ($0,003 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $407 \mu\text{mol L}^{-1}$) (MICHEL et al., 2004). Os herbicidas causam respostas diferentes devido a diferenças nas propriedades físico-químicas, absorção, degradação metabólica e locais alvos moleculares (MICHEL et al., 2004).

Em outro estudo com raízes de *E. plana*, os autores isolaram e testaram a atividade alelopática de diterpenos, cujo esqueleto químico é semelhante ao das substâncias **2**, **9** e **10**. Eles observaram inibição de 50% no crescimento de *Lemna paucicostata* (L.) Hegelm, nas concentrações de 59 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 109 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dependendo da substância analisada (FAVARETTO et al., 2019).

Diterpenos de outras classes, como clerodanos e labdanos, por exemplo, isolados de *Blakiella bartsiiifolia*, foram reportados como responsáveis por inibir o crescimento radicular e afetar a germinação de sementes de *Allium cepa* (RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2014; RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2017). Momilactonas exudadas das raízes de arroz, também são conhecidas por apresentar atividade alelopática (KATO-NOGUCHI e PETERS, 2013; WEI et al., 2019).

Sendo assim, os resultados observados nesse bioensaio, principalmente para as substâncias **2** e **10**, são promissores para modelos de novos herbicidas de origem natural.

5.0 CONCLUSÃO

Os resultados dos testes alelopáticos com os extratos brutos de *E. plana*, tanto na análise por MLG quanto na análise por PCA, mostraram que os extratos de raízes coletadas no verão e no inverno apresentaram maior potencial alelopático, pois foram capazes de aumentar o TMG e diminuir a PG, o IVG, o CR e o CPA da espécie receptora (*I. grandifolia*), podendo indicar que fatores ambientais abióticos são capazes de induzir mudanças na produção de diferentes classes de metabólitos especializados.

Observou-se também que a influência do solvente utilizado na extração mostrou relação direta com a estação do ano em que as raízes de *E. plana* foram coletadas, contudo, de maneira geral os extratos obtidos em éter de petróleo apresentaram maior atividade alelopática.

Pode-se inferir que os resultados observados nos testes alelopáticos têm relação com a diferença no perfil químico dos extratos brutos analisados por CLAE, uma vez que, os extratos em éter de petróleo (que apresentaram melhor atividade alelopática) produziram cromatogramas diferentes dos obtidos para os extratos em acetato de etila e metanol.

Para as análises antimicrobianas pode-se observar que *S. aureus* foi o microrganismo mais sensível frente a todos os extratos testados, podendo-se destacar o extrato bruto em acetato de etila, verão, como o que apresentou maior poder de inibição dessa bactéria.

O fracionamento dos extratos brutos das raízes de *E. plana* resultou no isolamento e determinação estrutural de diterpenos, inéditos na literatura, com esqueleto neocassano. As estruturas químicas das substâncias isoladas são caracterizadas principalmente pela presença de quatro grupos metílicos e uma ligação dupla terminal ou três grupos metílicos e duas ligações duplas terminais, sendo uma exocíclica. Além dessas diferenças no esqueleto químico, foi observado a presença de hidroxila e/ou carbonila variando nas posições C-2, C-3 e C-14.

Em se tratando dos testes fitotóxicos das substâncias puras, é importante ressaltar a grande dificuldade em realizá-los, em função da quantidade reduzida obtida de cada substância a ser testada, além da necessidade de solubilizá-las em água, a fim de seguir o protocolo dos testes.

A substância 3-hidroxineocassa-12(17),15-dieno (**10**) provocou redução no comprimento da parte aérea e no comprimento da radícula de *E. heterophylla* e *I. grandifolia*, respectivamente. Enquanto a neocassa-12(13),15-dieno-3,14-diona (**2**) reduziu o índice de velocidade de germinação das espécies receptoras, resultando no menor valor dessa variável quando comparado com o herbicida glifosato.

Esses resultados promissores encorajam a continuação dessa pesquisa, por meio de estudos mais detalhados da atividade alelopática dos diterpenos isolados, inclusive na verificação dos mecanismos de ação dessas substâncias, promovendo o desenvolvimento de modelos de novos herbicidas de origem natural – bio-herbicidas, ou ainda, podendo indicar um caminho para novos herbicidas.

6.0 REFERÊNCIAS

AGOSTINETTO, Dirceu; VARGAS, Leandro. **Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas no Brasil**. Passo Fundo – RS: GráficaBerthier, 2009.

ARANITI, Fabrizio; MANCUSO, Raffaella; LUPINI, Antonio; SUNSERI, Francesco; ABENAVOLIA, Maria Rosa; GABRIELE, Bartolo. Benzofuran-2-acetic esters as a new class of natural-like herbicides. **Pest Management Science**, 2019.

BAI, Jian; MU, Rong; DOU, Man; YAN, Daojiang; LIU, Bingyu; WEI, Qian; WAN, Jun; TANG, Yi; HU, Youcai. Epigenetic modification in histone deacetylase deletion strain of *Calcarisporium arbuscula* leads to diverse diterpenoids. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 4, p. 687–697, 2017.

BARBOSA, L. T. C.; VEJA, M. R. G. Diterpenos do Gênero *Xylopi*a. **Revista Virtual de Química**, v.9, n. 4, p. 1712-1733, 2017.

BATISTA Jr, João M.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Determination of the Absolute Configuration of Natural Product Molecules Using Vibrational Circular Dichroism, *In: Studies in Natural Products Chemistry*, v. 41, p. 383-417, 2014.

BITTENCOURT, Henrique V. H.; TREZZI, Michelangelo M.; BONOME, Lisandro T. da S.; TEIXEIRA, Sirlei D.; BITTENCOURT, Thiago B.; VARGAS, Aline G. Decomposition of both *Eragrostis plana* biomass and soil influences the phytotoxicity and chemical characteristics of extracts. **Científica**, Jaboticabal, v. 46, n. 2, p.116-125, 2018.

BOECHAT, Sonja De C.; LONGHI-WAGNER, Hilda M. Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Eragrostis* (Poaceae, Chloridoideae). **Revista brasileira Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 177-194, 2000.

BOLZANI, Vanderlan da S. Biodiversidade, Bioprospecção e Inovação no Brasil. **Tendências**, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2016.

BORELLA, Junior; PASTORINI, Lindamir H. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. **Revista Biotemas**, v. 22, n.3, 2009.

BURGUEÑO-TAPIA, Eleuterio; CHÁVEZ-CASTELLANOS, Katia; CEDILLO-PORTUGAL, Ernestina; JOSEPH-NATHAN, Pedro. Absolute configuration of diterpenoids from *Jatropha dioica* by vibrational circular dichroism. **Tetrahedron: Asymmetry**, 2016.

CARMO, Flávia M, da S.; BORGES, Eduardo E. de L.; TAKAKI, Massanori. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocoteaodorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n.3, p. 697-705, 2007.

CAREY, Francis A.; SUNDBERG, Richard J. **Advanced Organic Chemistry**, 5 ed. Springer, 2007.

CHIPLUNKAR, Yamini G.; NAGASAMPAGI, Bhimsen A. Isolation and Structure Elucidation of a New Isopimarane from *Pulicaria Wightiana*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 9, p, 1328-1329, 1992.

CHENG, F.; CHENG, Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

CONSTANTIN, Jamil; OLIVEIRA, Robem S. **Plantas Daninhas e seu Manejo**. Guaíba RS: Livraria e editora Agropecuária Ltda, 2001.

CLSI, **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard**, 3 ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI, **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard**, 9 ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

DALBOSCO, Talita. **Avaliação do Potencial Alelopático dos Extratos Foliares Brutos do Capim-Annoni-2 (*Eragrostis Plana* Nees) e Estudo do Óleo Essencial**, 2013, 104f, Dissertação Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

DASTAN, Dara; SALEHI, Peyman; GHANATI, Faezeh; GOHARI, Ahmad Reza; Hossein Maroofi; ALNAJAR, Naba, Phytotoxicity and cytotoxicity of disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 43–48, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**, 2 ed, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DOTTO, Talia C. Dos S. R.; VESTENA, Silvane; COSTA, Alice L., SANTOS, Carine A. dos; WALLAU, Viviane F. **Efeito Alelopático de Extratos Aquosos de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* NEES) Sobre Espécies Olerícolas**. V.9, n.3 (2017) - Iniciação Científica - Pesquisa - Apresentação Oral.

DUKE, Stephen O.; POWLES, Stephen B. Mini-review - Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, p. 319–325, 2008.

DUKE, Stephen O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years?. **Pest Management Science**, v. 68, p. 505–512, 2011.

DUKE, Stephen O. Proving Allelopathy in Crop–Weed Interactions. **Weed Science**, v. 63, p. 121–132, 2015.

DUTRA, Rafael C.; CAMPOS, Maria M.; SANTOS, Adair R. S.; CALIXTO, João B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives, **Pharmacological Research**, p. 25, 2016.

FAVARETTO, A.; SANTOS, J.; CARNEIRO, C. M.; BASSO, S. M. S. The First Anatomical and Histochemical Study of Tough Lovegrass (*Eragrostis plana* Nees, *Poaceae*). **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 30, p. 2940–2947, 2015.

FAVARETTO, Adriana; TONIAL, Fabiana; BERTOL, Charise D.; SCHEFFER-BASSO, Simone M. Antimicrobial activity of leaf and root extracts of tough lovegrass. **Comunicata Scientiae**, v. 7, n. 4, p. 420–427, 2016.

FAVARETTO, Adriana; CANTRELL, Charles Lowell; FRONCZEK, Frank R; DUKE, Stephen O.; WEDGE, David E.; ALI, Abbas; SCHEFFER-BASSO, Simone Meredith. New Phytotoxic Cassane-Like Diterpenoids from *Eragrostis plana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 1973–1981, 2019.

FERREIRA Nadilson R.; MEDEIROS Renato B. de; SOARES, Geraldo L. G. Potencial alelopático do Capim-Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Semente**, v. 30, p. 43–50, 2008.

FERREIRA, Mariana C.; CANTRELL, Charles L.; DUKE, Stephen O.; ALI, Abbas; ROSA, Luiz H. New Pesticidal Diterpenoids from *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), an Endemic Neotropical Plant Living in the Endangered Brazilian Biome Rupestrian Grasslands. **Molecules**, v. 22, 2017.

FILEP, Rita; PAL, Robert W.; BALÁZS, Viktória L.; MAYER, Mátyás; NAGY, David U.; COOK, Bradley J.; FARKAS, Ágnes. Can seasonal dynamics of allelochemicals play a role in plant invasions? A case study with *Helianthus tuberosus* L. **Plant Ecology**, v. 217, p. 1489–1501, 2016.

FILHO, Raimundo B. Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Química Nova**, v. 33, 2010.

FIORENZA, M.; DOTTO, D. B.; BOLIGON, A. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; VESTENA, S. Análise Fitoquímica e Atividade Alelopática de Extratos de *Eragrostis plana* Nees (Capim-Annoni). **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 71, n. 2, p. 193–200, 2016.

FRANCO, Danilo M.; SALDANHA, Luiz L.; NETO, José de S. L.; SANTOS, Lourdes C. dos; DOKKEDAL, Anne L.; ALMEIDA, Luiz F. R. de. Seasonal variation in allelopathic potential of the leaves of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Acta Botanica Brasilica**, v. 30, n. 2, p. 157–165, 2016.

GHATAK, Arindam; CHATURVEDI, Palak; Weckwerth, Wolfram. Metabolomics in Plant Stress Physiology. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 164, p. 187–236, 2018.

GIMENES, Leila; BATISTA JUNIOR, Joao Marcos; SANTOS JUNIOR, Fernando Martins dos; SOUZA, Matheus da Silva; LUNA-DULCEY, Liany; ELLENA, Javier Esteves; COMINETTI, Marcia Regina; SILVA, Maria Fatima das Graças Fernandes da; VIEIRA, Paulo Cezar; FERNANDES, Joao Batista; STAERK, Dan. Picraviane A and B: Nortriterpenes with limonoid-like skeletons containing a heptanolide E-ring system from *Picramnia glazioviana*. **Phytochemistry**, v. 163, p. 38–45, 2019.

GÓMEZ-HURTADO, Mario A.; TORRES-VALENCIA, J. Martín; MANRÍQUEZ-TORRES, Jesús; RÍO, Rosa E. del; MOTILVA, Virginia; GARCÍA-MAURÍÑO, Sofía; ÁVILA, Javier; TALERO, Elena; CERDA-GARCÍA-ROJAS, Carlos M.; JOSEPH-NATHAN, Pedro. Absolute configuration of labdanes and ent-clerodanes from *Chromolaena pulchella* by vibrational circular dichroism. **Phytochemistry**, v.72, p. 409–414, 2011.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. 2019. Disponível em www.weedscience.org. Acesso em 23/07/2020.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M. G.; MORAIS, S. A. L.; FERREIRA, S.; SANTOS, D. Q.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Estudo Fitoquímico e Alelopático do Extrato de Caule de Sucupira-Branca (*Pterodonemarginatus*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, 2007.

HENDGES, A. P. P. K. **Estudo Fitoquímico das Folhas de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) Coletadas no Inverno e Verão**. 2015. 105f. Dissertação Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

HURTADO-FERNÁNDEZ, Elena; PACCHIAROTTA, Tiziana; GÓMEZ-ROMERO, María; SCHOENMAKER, Bart; DERKS, Rico; DEELDER, André M.; MAYBORODA, Oleg A.; CARRASCO-PANCORBOA, Alegria; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto, Ultra high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry for analysis of avocado fruit metabolites: Method evaluation and applicability to the analysis of ripening degrees. **Journal of Chromatography A**, n. 1218, p. 7723– 7738, 2011.

JESUS, Raphael A. de; PRADO, Vilma M. J.; PINTO, Vanderson S.; SILVA, Valdenizia R.; SANTOS, Luciano S.; NOGUEIRA, Paulo C. L.; NAVICKIENE, Sandro; PEREIRA-FILHO, Edenir R.; BLANK, Arie F.; BEZERRA, Daniel P.; SOARES, Milena B. P.; SEIDL, Claudia; CARDOSO, Carmen L.; MORAES, Valéria R. S. Application of LC-DAD Metabolic Fingerprinting in Combination with PCA for Evaluation of Seasonality and Extraction Method on the Chemical Composition of Accessions from *Lippia alba* (Mill.) N, E, Brown and Biological Activities.

Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 30, n. 5, 2019.

JUNTILA, O. Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as affected by temperature during seed development. **Physiology plant**, v. 29, p. 264-268, 1976.

KATO-NOGUCHI, Hisashi; KUJIME, Hiroya; INO, Takeshi, UV-induced momilactone B accumulation in rice rhizosphere. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1548 - 1551, 2007.

KATO-NOGUCHI, Hisashi; KOBAYASHI, Kanami. Jasmonic acid, protein phosphatase inhibitor, metals and UV-irradiation increased momilactone A and B concentrations in the moss *Hypnum plumaeforme*. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1118 - 1122, 2009.

KATO-NOGUCHI, Hisashi; PETERS, Reuben J. The Role of Momilactones in Rice Allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 175–185, 2013.

KNEZEVIC, S. Z.; JHALA, A.; GAINES, T. Herbicide Resistance and Molecular Aspects. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, p. 455-458, 2017.

KOGA, Jinichiro; SHIMURA, Masaru; OSHIMA, Kiyomi; OGAWA, Noriko; YAMAUCHI, Toyozo; OGASAWARA, Nagahiro. Phytocassanes A, B, C and D, Novel Diterpene Phytoalexins from Rice, *Oryza sativa* L. **Tetrahedron**, v. 51, n. 29, p. 7907-7918, 1995.

LARCHER, Walter. **Ecofisiologia Vegetal**. São Paulo: Rima, 2000.

LEE, Dong-Kyu; YOON, Min Hye; KANG, Yun Pyo; YU, Jin; PARK, Jeong Hill; LEE, Jeongmi; KWON, Sung Won. Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to

discriminate the origins of *Schisandra chinensis* by GC/MS and LC/MS. **Food Chemistry**, n. 141, p. 3931–3937, 2013.

LI, Jing; LIU, Xingang; DONG, Fengshou; XU, Jun; LI, Yuanbo; SHAN, Weili; ZHENG, Yongquan, Potential allelopathic effects of volatile oils from *Descurainiasophia* (L.)Webb ex Prantl on wheat. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39 p. 56–63, 2011.

LIMA, Cristina P. de; CUNICO, Miriam M.; TREVISAN, Roberta R.; PHILIPPSEN, Andressa F.; MIGUEL, Obdúlio G.; MIGUEL, Marilis D. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, 2011.

MACÍAS, Francisco A.; MOLINILLO, Jose M. G.; VARELA, Rosa M.; GALINDO, Juan C. G. Review Allelopathy – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, p.327–348, 2007.

MACÍAS, Francisco A.; MOLINILLO, José M. G.; GALINDO, Juan C. G.; VARELA, Rosa M.; SIMONET, Ana M.; CASTELLANO, Diego. The Use of Allelopathic Studies in the Search for Natural Herbicides. **Journal of Crop Production**, v. 4, p. 237-255, 2008.

MAESTRI, M.; ALVIM, P. T.; SILVA, M. A. P.; MOSQUIN, P. R.; PUSHMANN, R; CANO, M. A. O.; BARROS, R. S. **Fisiologia Vegetal: exercícios práticos**, 4ª Reimpressão (2002), Viçosa: UFV, 1998.

MAFU, Sibongile; DING, Yezhang; MURPHY, Katherine M.; YAACOOBI, Omar ; ADDISON, J. Bennett; WANG, Qiang; SHEN, Zhouxin; BRIGGS, Steven P.; BOHLMANN, Jörg; CASTRO-FALCON, Gabriel; HUGHES, Chambers C.; BETSIASHVILI, Mariam; HUFFAKER, Alisa; SCHMELZ, Eric A.; ZERBEA, Philipp. Discovery, Biosynthesis and Stress-Related Accumulation of Dolabradiene-Derived Defenses in Maize. **Plant Physiology**, v. 176, p. 2677-2690, 2018.

MICHEL, Albrecht; JOHNSON, Robert D.; DUKE, Stephen O.; SCHEFFLER, Brian E. Dose–Response Relationships Between Herbicides with Different Modes of Action and Growth of *Lemna Paucicostata*: An Improved Ecotoxicological Method. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 1074–1079, 2004.

NISHIYA, K.; KIMURA, T.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; LEE, S. R. Diterpenoids From *Eragrostis Ferruginea*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 7, p. 2410-2411, 1991.

OLIVEIRA, Sarah C. C.; GUALTIERI, Sonia C. J.; DOMÍNGUEZ, Francisco A. M.; MOLINILLO, José M. G.; MONTOYA, Rosa V. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A, St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta botânica brasílica**, v. 26 n. 3, 2012.

OLIVEIRA, Ademir K. M.; PEREIRA, Kelly C. L.; MULLER, Jéssica A. I.; MATIAS, Rosemary. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura brasileira**, v. 32, n. 1, 2014.

ORTEGA, Humberto E.; BATISTA JR., João M.; MELO, Weilan G. P.; DE PAULA, Gabriela T.; PUPO, Mônica T. Structure and Absolute Configuration of Secondary Metabolites from Two Strains of *Streptomyces chartreusis* Associated with Attine Ants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2672-2680, 2019.

PAZUCH, D.; TREZZI, M. M.; GUIMARÃES, A. C. D.; BARANCELLI, M. V. J.; PASINI, R.; VIDAL, R. A. Evolution of Natural Resistance to Glyphosate in Morning Glory Populations. **Planta Daninha**, v. 35, e017159430, 2017.

PEREIRA, Renata J.; CARDOSO, Maria das G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEROTTI, Valeria E.; LARRAN, Alvaro S.; PALMIERI, Valeria E.; MARTINATTO, Andrea K.; PERMINGEAT, Hugo R. Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. **Plant Science**, v. 290, 110255, 2020.

PINTO, Graciele F. de S.; KOLB, Rosana M. Seasonality affects phytotoxic potential of five native species of Neotropical savanna. **Botany**, v. 94, p. 1–9, 2016.

POLWES, Stephen B.; HOLTUM, Joseph A. M. **Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**, Reissued by CRC Press, 2018.

REINA, Matías; BURGUEÑO-TAPIA, Eleuterio; BUCIO, María A.; JOSEPH-NATHAN, Pedro. Absolute configuration of tropane alkaloids from *Schizanthus* species by vibrational circular dichroism. **Phytochemistry**, n. 71, p. 810–815, 2010.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, Diego; OLIVEROS-BASTIDAS, Alberto; ALONSO-AMELOT, Michel E.; CALCAGNO-PISSARELLI, Maria Pia. Diterpene Foliar Exudates of *Blakiella bartsiiifolia* and Phytotoxicity of Clerodanes. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 10, p. 1407-1412, 2014.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, Diego; OLIVEROS-BASTIDAS, Alberto; ALONSO-AMELOT, Miguel E.; CALCAGNO-PISSARELLI, Maria Pia. Two New Labdane Diterpenoids from the Foliar Exudates of *Blakiella bartsiiifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 20, p. 269-273, 2017.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo Fitoquímico de *Senna Alata* por duas Metodologias. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, 2009.

RODRIGUES, A. P. A, C.; LAURA, V. A.; PEREIRA, S. R.; DEISS, C. Alelopatia de duas espécies de braquiária em sementes de três espécies de estilosantes. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1758-1763, 2012.

ROENGSUMRAN, S.; PATA, P.; RUENGRAWEEWAT, N.; TUMMATORN, J.; PORNPAAKAKUL, S.; SANGVANICH, P.; PUTHONG, S.; PETSOM, A. New Cleistanthane Diterpenoids and 3,4-Seco-Cleistanthane Diterpenoids from *Croton oblongifolius*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 5, 2009.

SAMPAIO, Bruno Leite; EDRADA-EBEL, RuAngelie; COSTA, Fernando Batista Da. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, 2016.

SCHMELZ, E. A.; KAPLAN, F.; HUFFAKER, A.; DAFOE, N. J.; VAUGHAN, M. M.; NI, X.; ROCCA, J. R.; ALBORN, H. T.; TEAL, P. E. Identity, Regulation, and Activity of Inducible Diterpenoid Phytoalexins in Maize. **PNAS**, v. 108, n. 13, p. 5455–5460, 2011.

SCOGNAMIGLIO, Monica; SCHNEIDER, Bernd. Identificação de aleloquímicos potenciais de plantas doadoras e seus efeitos sinérgicos no metaboloma de *Aegilops geniculata*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

SEBASTIÃO, N 'Soki N.; CORDEIRO, Inês J. S.; SANTOS, Aldenir F.; GASPAR, Jorge F.; MARTINS, Célia; RUEFF, José; DIAKANAMWA, Carlos; SANT'ANA, Antônio E. G.; MENDONÇA, Dina I. M. D. 8,15-Epoxyabdane and norlabdane diterpenoids from *Eragrostis viscosa*. **Phytochemistry**, v. 71, 2010.

SEBASTIÃO, N'S N.; FERNANDES, N.; VIEIRA, L.; MENDONÇA, A. J. G.; GASPAR, J. F.; MARTINS, C.; RUEFF, J.; DIAKANAMWA, C.; MENDONÇA, D. I. M. D. de. Three New Labdanes Isolated from *Eragrostis viscosa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1940-1950, 2012.

SILVA, Ana Maria A. da; COELHO, Ivan D.; MEDEIROS, Paulo R. de. Levantamento florístico das plantas daninhas em um parque público de Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 21 n. 4, 2008.

SILVA, Antonio A. da; SILVA, José F. da. **Tópicos em Manejo de Plantas Daninhas**, Viçosa – MG: Editora UFV, 2007.

SILVA, M. G. F. da. **Avaliação do Potencial Alelopático de Raízes de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) e Estudo Fitoquímico**. 2014. 99 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6º ed, Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SOLTYS, Dorota; KRASUSKA, Urszula; BOGATEK, Renata; GNIAZDOWSKA, Agnieszka. Allelochemicals as Bioherbicides - Present and Perspectives. Em: PRICE, Andrew; KELTON, Jessica. **Herbicides - Current Research and Case Studies in Use**, p. 517-541, 2013.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Metodologias empregadas em estudos da atividade alelopática em condições de laboratório – revisão crítica. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo, **Fisiologia Vegetal**, 5 ed, Porto Alegre: Artmed, 2013,

THIÉBAUT, Gabrielle; THOUVENOT, Lise; RODRÍGUEZ-PÉREZ, Hector. Allelopathic Effect of the Invasive *Ludwigia hexapetala* on Growth of Three Macrophyte Species. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

THOLL, D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 2014.

TISSIER, A.; ZIEGLER, J.; VOGT, T. Specialized Plant Metabolites: Diversity and Biosynthesis, Ecological Biochemistry: **Environmental and Interspecies Interactions**, p. 14-37, 2015.

TUR, C. M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Alelopátia de Extratos Aquosos de *Duranta repens* Sobre a Germinação e o Crescimento Inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 2, 2010.

VAISHNAV, Preeti; DEMAINE, Arnold L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223 – 229, 2010.

VATS, Sharad. Herbicides: History, Classification and Genetic Manipulation of Plants for Herbicide Resistance, Sustainable. **Agriculture Reviews**, v. 15, 2015.

VARGAS, L.; NOHATTO, M.A.; AGOSTINETTO, D.; BIANCHI, M.A.; PAULA, J.M.; POLIDORO, E.; TOLEDO, R.E. Práticas de Manejo e a Resistência de *Euphorbia heterophylla* aos Inibidores da ALS e Tolerância ao Glyphosate no Rio Grande Do Sul. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 427-432, 2013.

XU, M.; GALHANO, R.; WIEMANN, P.; BUENO, E.; TIERNAN, M.; WU, W.; CHUNG, III-M.; GERSHENZON, J.; TUDZYNSKI, B.; SESMA, A.; PETERS, R. J. Genetic Evidence for Natural Product Mediated Plant–Plant Allelopathy in Rice. **New Phytol**, v. 193, n. 3, p. 570–575, 2011.

ZENNI, Rafael D.; ZILLER, Sílvia R. An overview of invasive plants in Brazil. **Revista Brasil, Botânica**, v. 34, n. 3, p. 431-446, 2011.

ZHU, Ao; YANG, Meng-Yue; ZHANG, Ya-Hui; SHAO, Chang-Lun; WANG, Chang-Yun; HU, Lian-Dong; CAO, Fei; ZHU, Hua-Jie. Absolute Configurations of 14,15-Hydroxylated Prenylxanthones from a Marine-Derived *Aspergillus* sp. Fungus by Chiroptical Methods. **Scientific Reports**, 2018.

ZIMDAHL, R. L. The Problem and Study of Herbicide Resistance. *In*: **FUNDAMENTALS OF WEED SCIENCE**, p. 535-555, 2018.

WEI, Wenjun; LI, Ya; LI, Hangying; MA, Kailiang; WANG, Liudi; GAO, Kun. Phytotoxic Diterpenoids from Plants and Microorganisms **Chemistry Biodiversity**, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Fórmulas para os cálculos de PG, TMG e IVG.

Nome	Fórmula	Legenda	Fonte
Tempo Médio de Germinação (TMG)	$TMG = \frac{\sum n_i \times t_i}{\sum n_i}$	n_i : número de sementes germinadas no tempo i; t_i : tempo em dias após o início do bioensaio; i : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8; Unidade : dias.	LABOURIAU, 1983
Porcentagem de Germinação (PG)	$G = \left(\frac{N}{T} \right) \times 100$	N : número de sementes germinadas (contagem do último dia); T : número total de sementes dispostas para germinar; Unidade : %.	BRASIL, 1992
Índice de Velocidade de Germinação (IVG)	$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn}$	G1, G2,..., Gn : número de sementes germinadas nas observações diárias; N1, N2,..., Nn : número de dias após a semeadura; Unidade : dia ⁻¹ .	(FERREIRA; BORGHETTI, 2004),

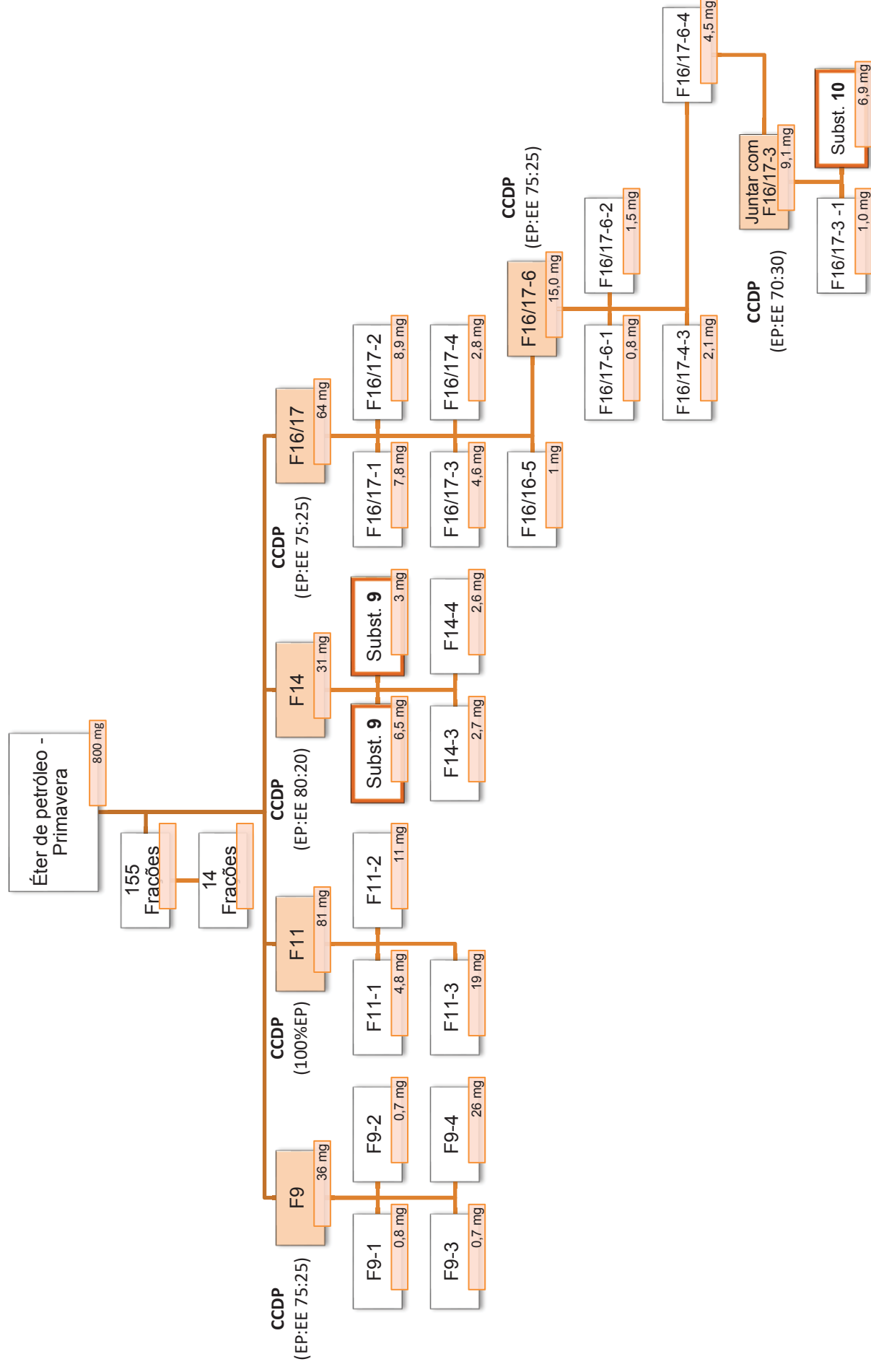
APÊNDICE 2 - Dados Cristalográficos das substâncias 1 e 2

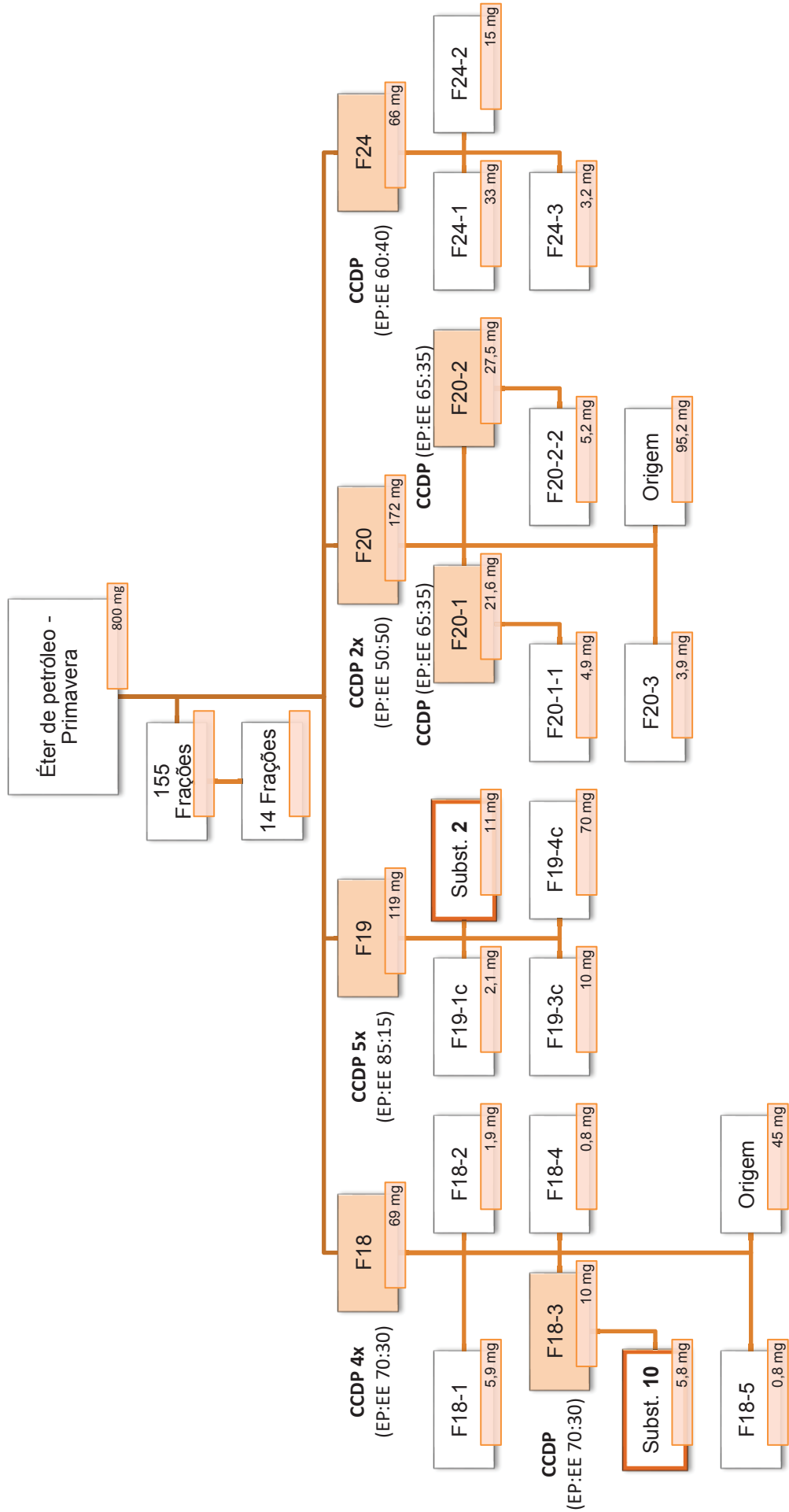
Dados do cristal	1	2
Fórmula Molecular	C ₂₀ H ₃₀ O	C ₂₀ H ₂₈ O ₂
Massa Molar / g mol ⁻¹	286.44	300.42
Temperatura / K	299(2)	288(2)
Tipo de Radiação	Mo K α	Mo K α
Sistema do Cristal, grupo espacial	Monoclinico, P2 ₁	Ortorombico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a / Å	6.2593(14)	6.4025(4)
b / Å	11.449(3)	11.0913(7)
c / Å	12.078(3)	23.6652(14)
α / °	90	90
β / °	98.210(5)	90
γ / °	90	90
Volume / Å ³	856.6(3)	1680.51(18)
Z	2	4
Densidade / Mg m ⁻³	1.110	0.074
F(000)	316	656
Coeficiente de Absorção / mm ⁻¹	0.066	0.074
Tamanho do Cristal / mm	0.452 x 0.415 x 0.070	0.314 x 0.228 x 0.116
θ range / °	3.3 a 24.5	3.2 a 26.0
Completeness / %	99.7	99.7
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes
T _{max} , T _{min}	0.7455, 0.6747	0.7455, 0.7057
Reflexão coletada	17626	74131
Dados únicos	2850 [R _{int} = 0.048]	3276 [R _{int} = 0.071]
Dados observados [I > 2 σ (I)]	2309	2731
Número de parâmetros / restrições	195 / 1	311 / 6
Qualidade de ajuste em F ²	1.189	1.062
R [I > 2 σ (I)], R _w	R = 0.084, R _w = 0.278	R = 0.041 R _w = 0.094
R, R _w (todos os dados)	R = 0.099, R _w = 0.290	R = 0.055, R _w = 0.100
Maior diferença pico e buraco / e Å ⁻³	0.32 e -0.19	0.19 e -0.15

$w = [\sigma^2(\text{Fo}^2) + (0.1920 * P)^2 + 0.1695 * P]^{-1}$ quando $P = (\text{Fo}^2 + 2\text{Fc}^2)/3$ para **1**.

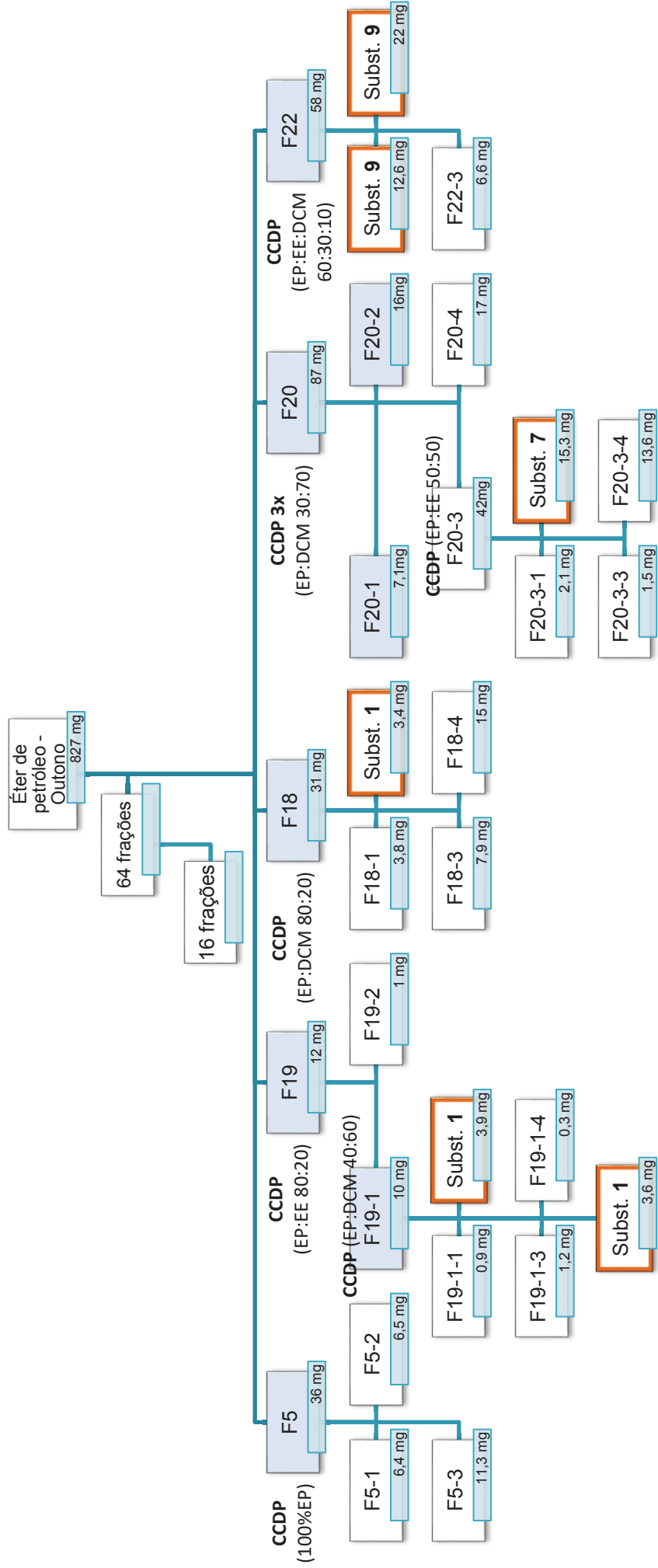
$w = [\sigma^2(\text{Fo}^2) + (0.0511 * P)^2 + 0.2382 * P]^{-1}$ quando $P = (\text{Fo}^2 + 2\text{Fc}^2)/3$ para **2**.

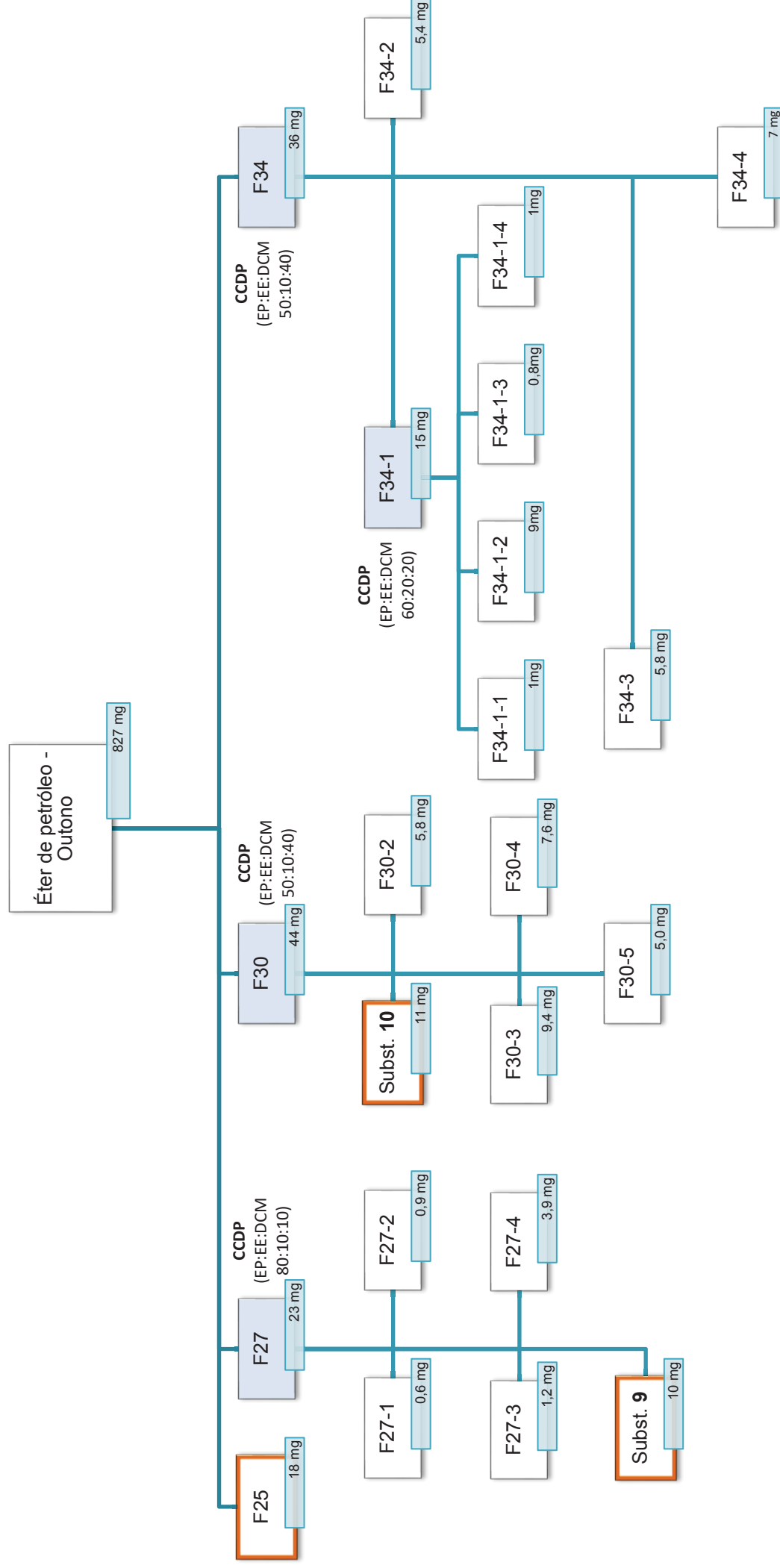
APÊNDICE 3 - Fluxograma da purificação do extrato em éter de petróleo primavera

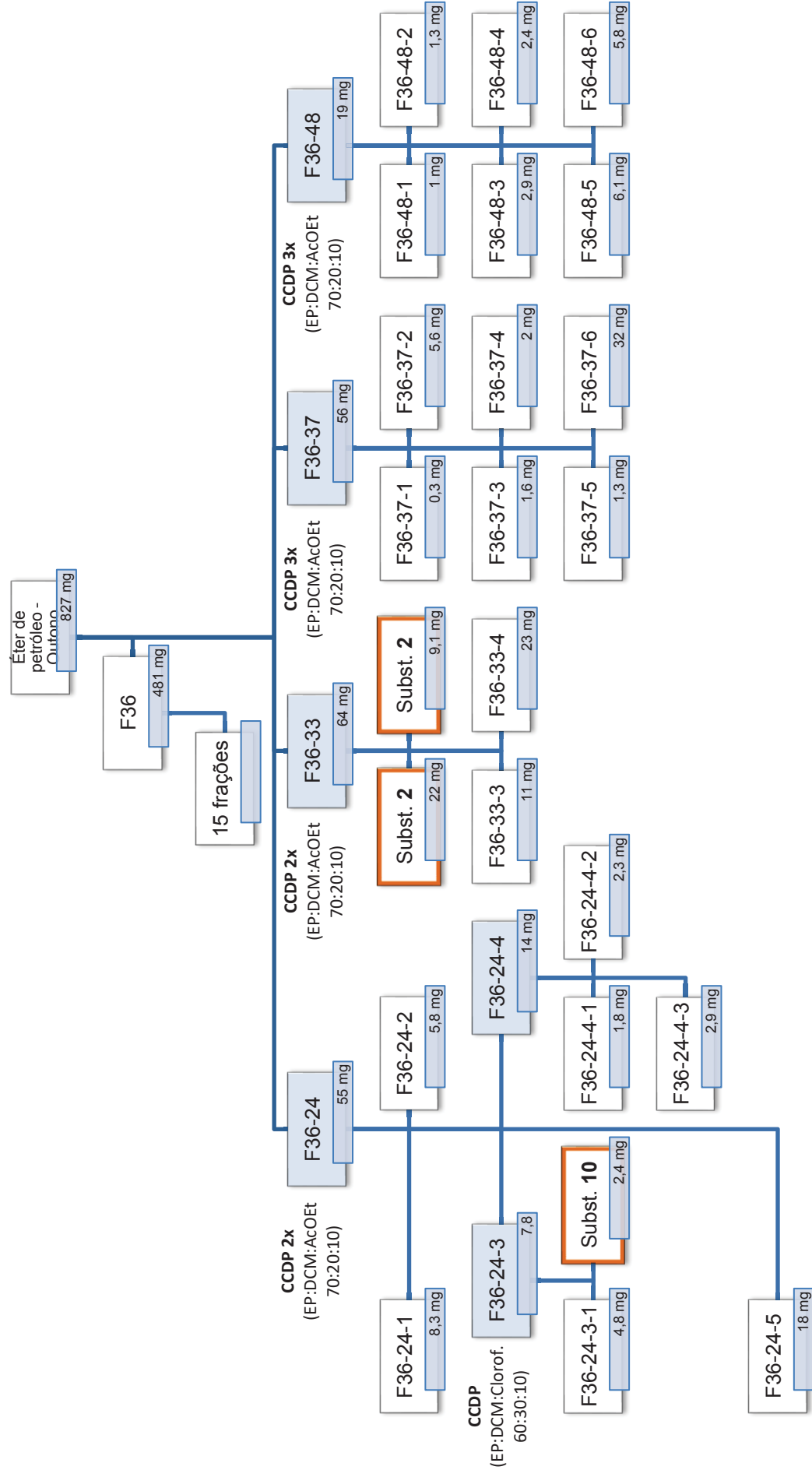




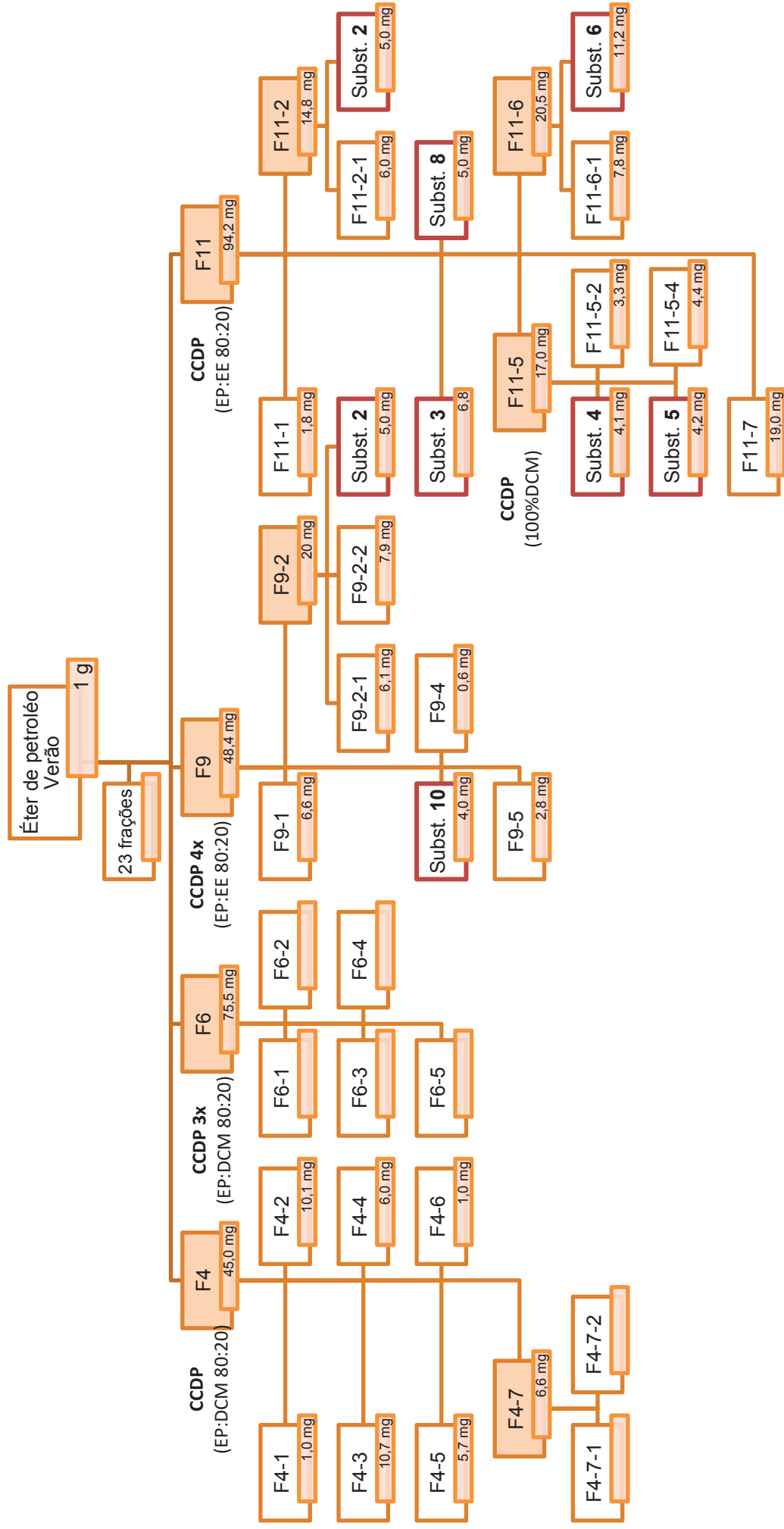
APÊNDICE 4 - Fluxograma da purificação do extrato em éter de petróleo outono

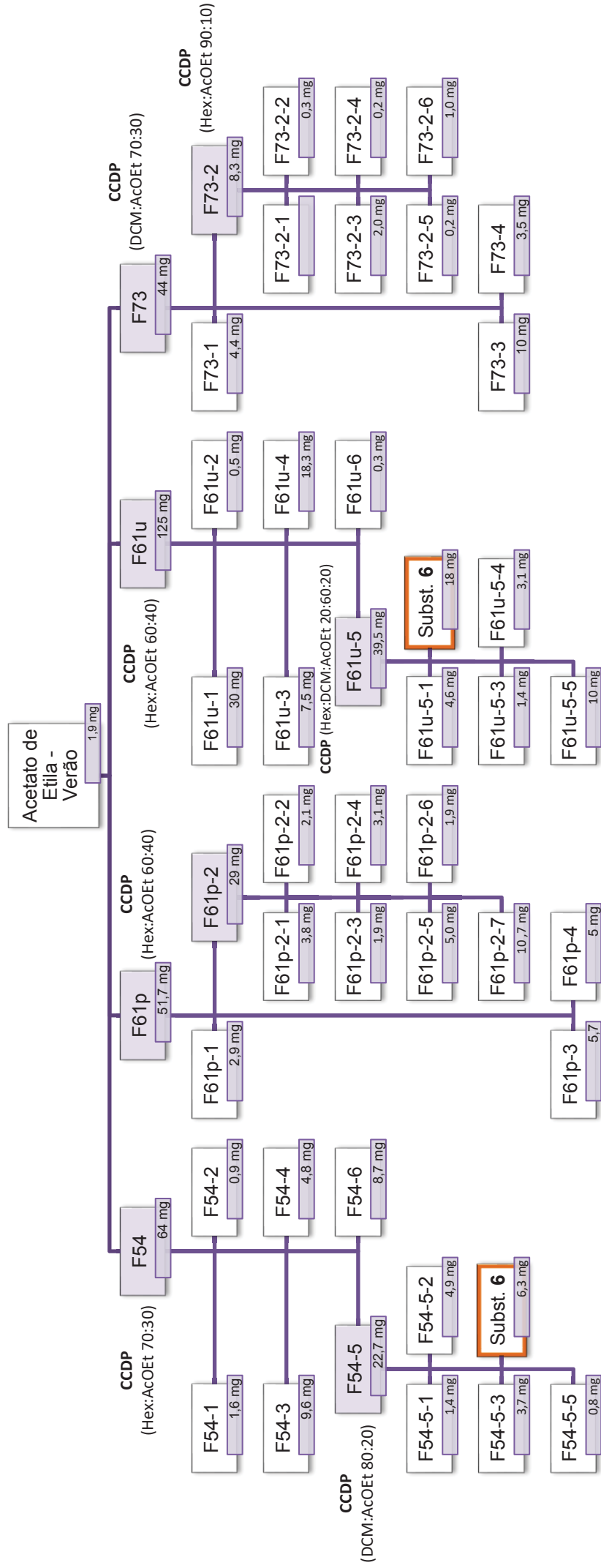




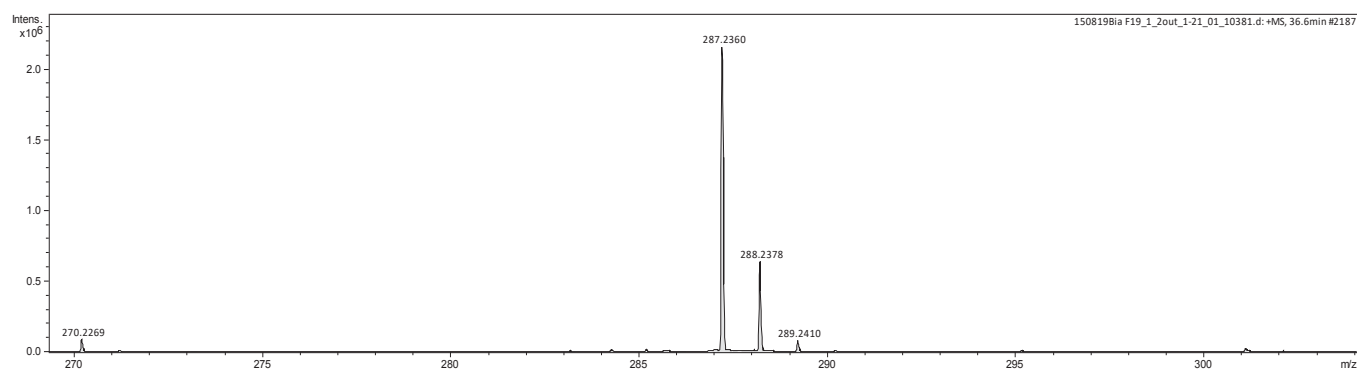


APÊNDICE 5 - Fluxograma da purificação do extrato em éter de petróleo verão



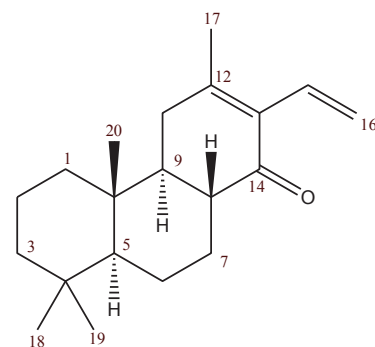
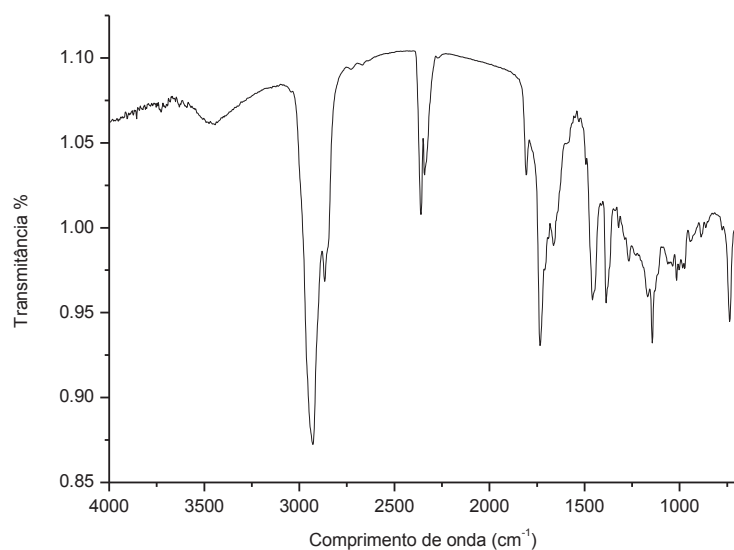


APÊNDICE 7 - Espectro de Massas da Substância 1

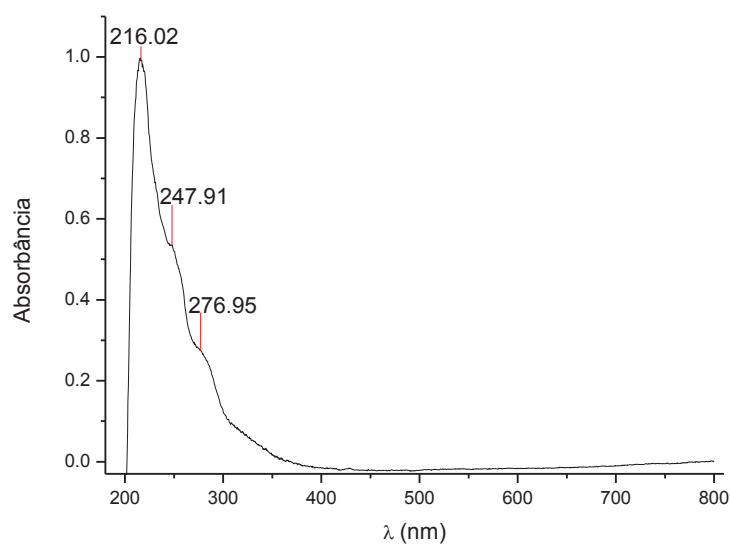


APÊNDICE 8 - Espectro de Infravermelho da Substância

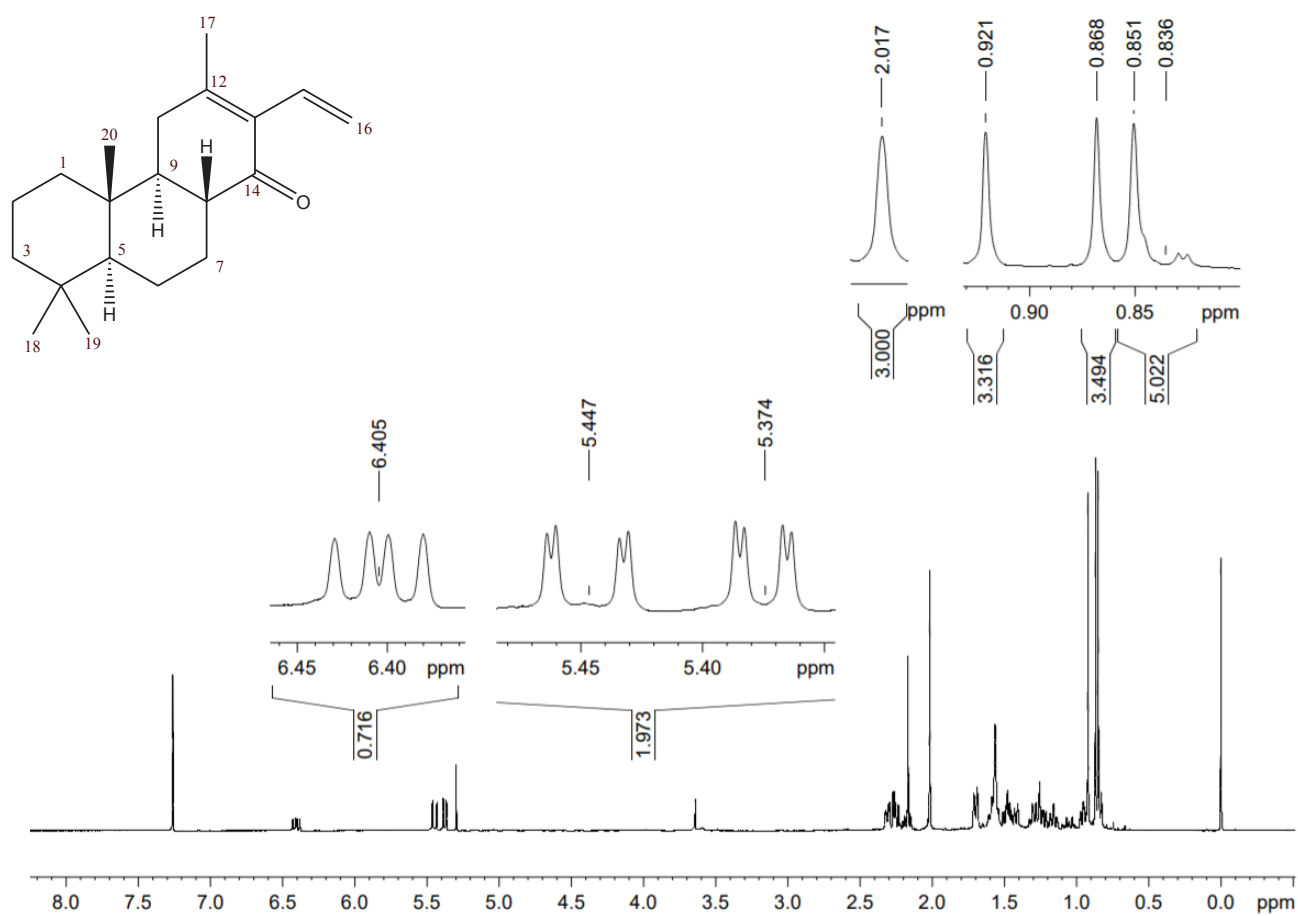
1



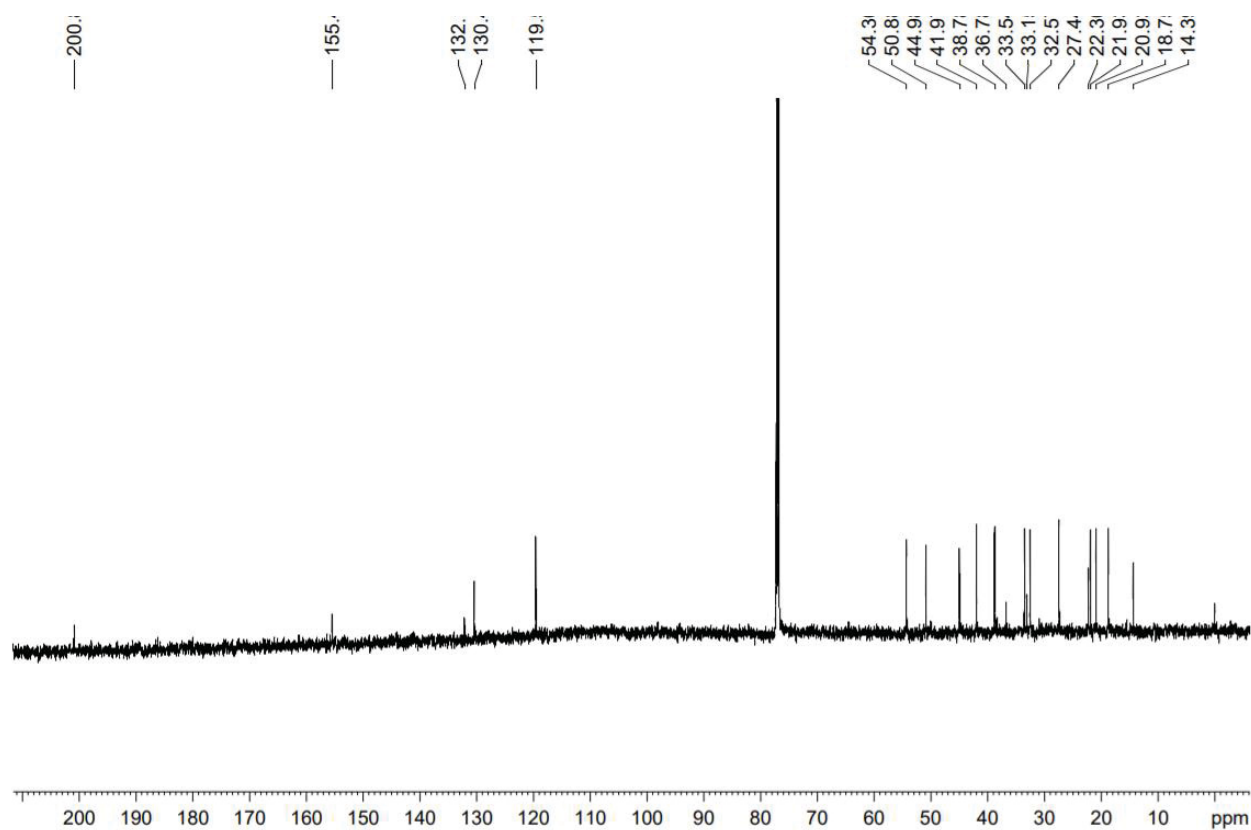
APÊNDICE 9 - Espectro UV-vis da Substância 1

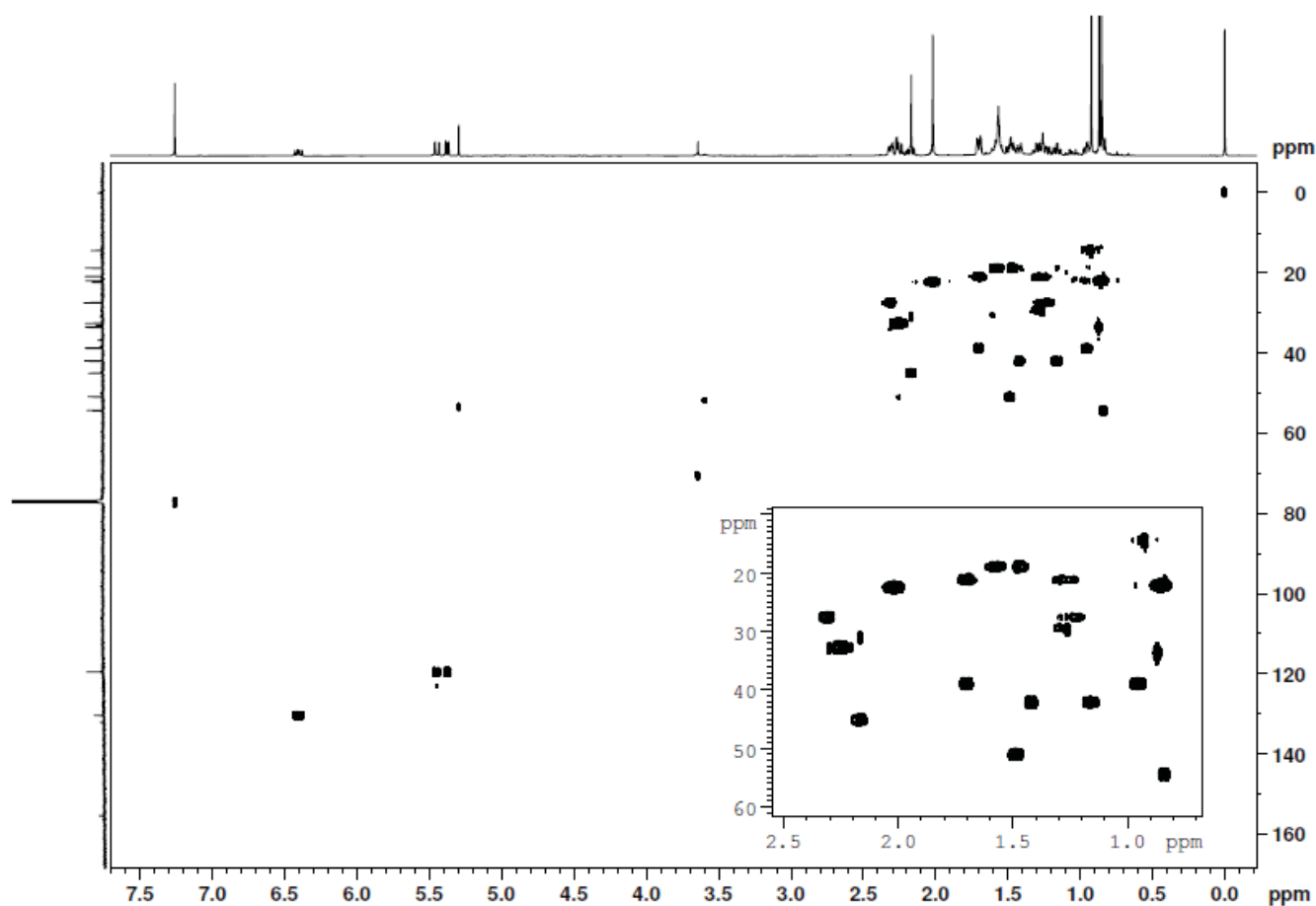
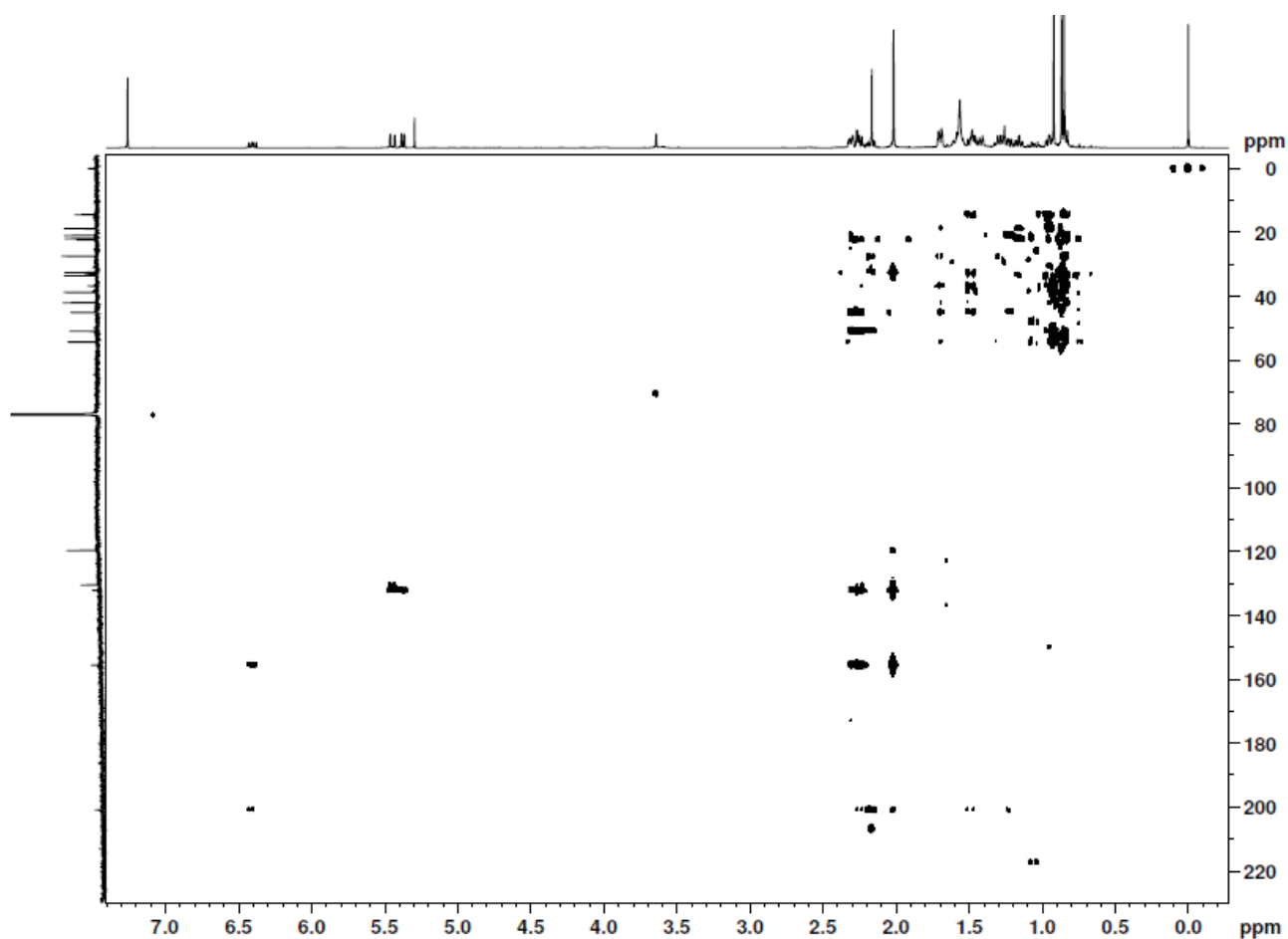


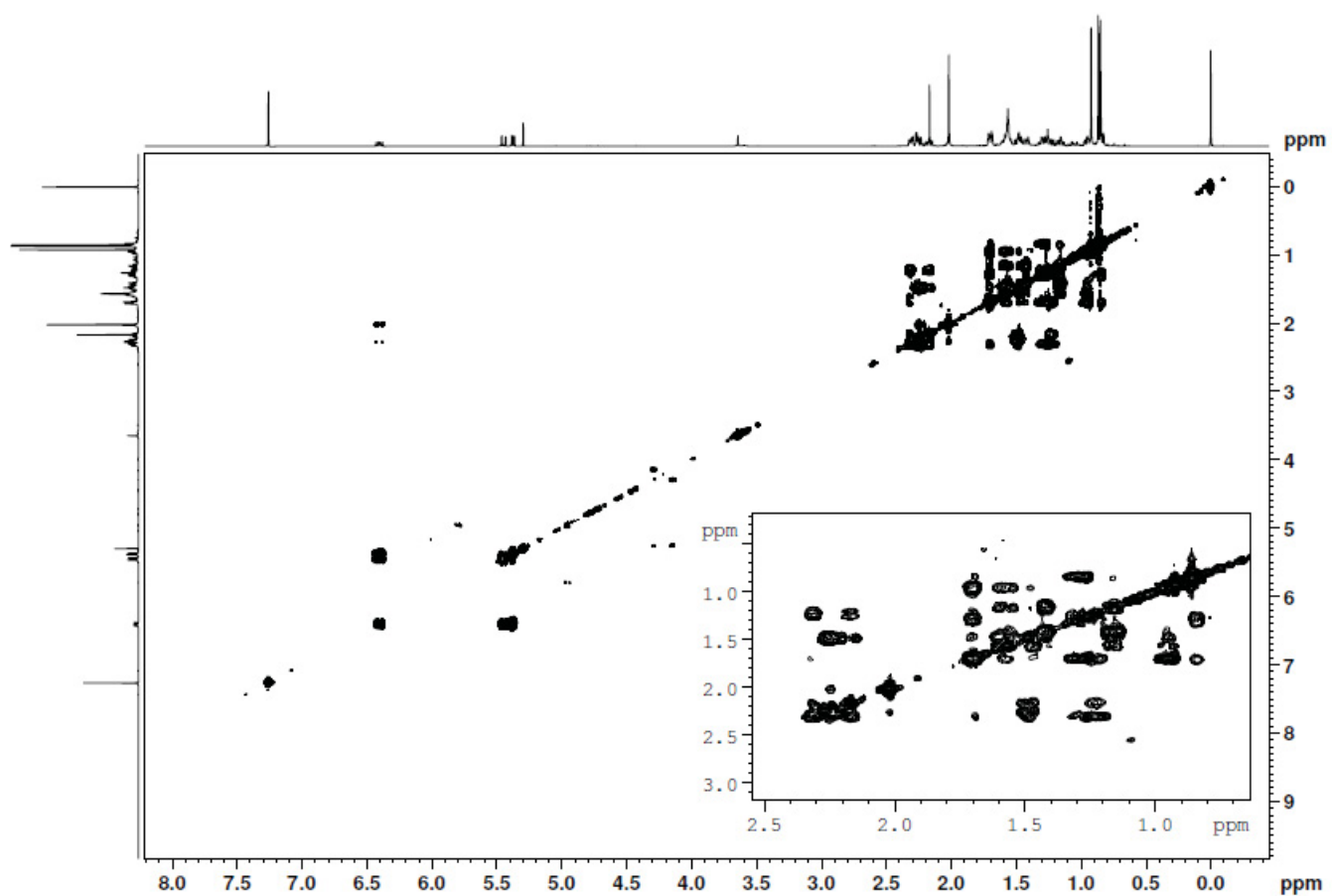
APÊNDICE 10 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da Substância **1**



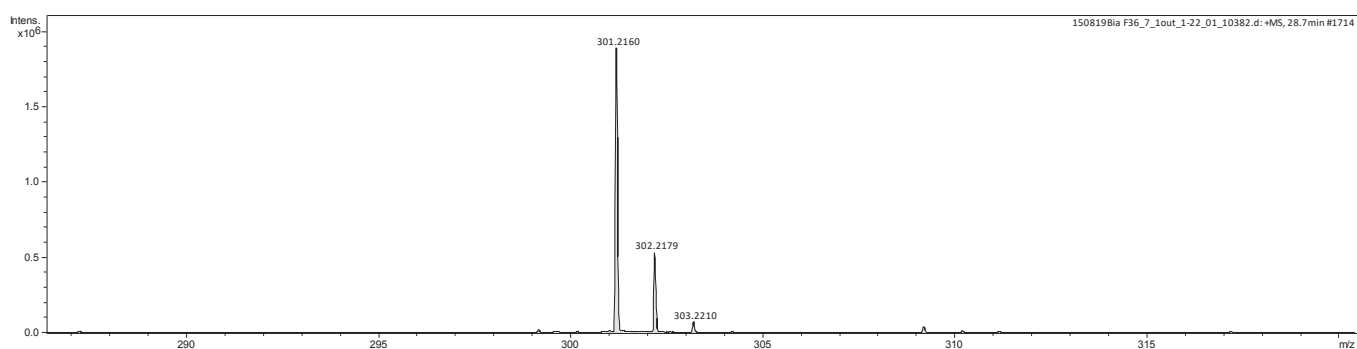
APÊNDICE 11 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da Substância **1**



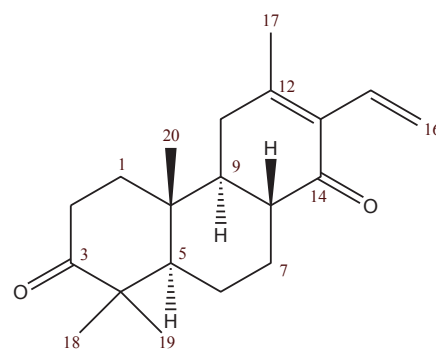
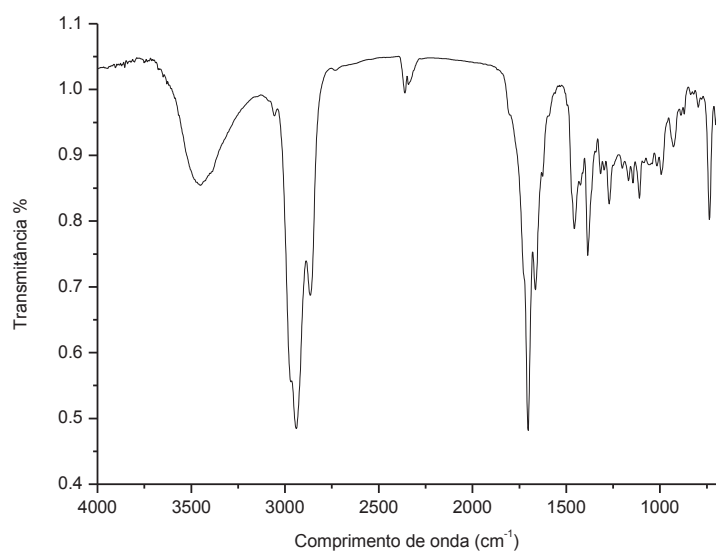
APÊNDICE 12 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância 1APÊNDICE 13 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância 1

APÊNDICE 14 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 600 MHz, CDCl_3) da Substância 1

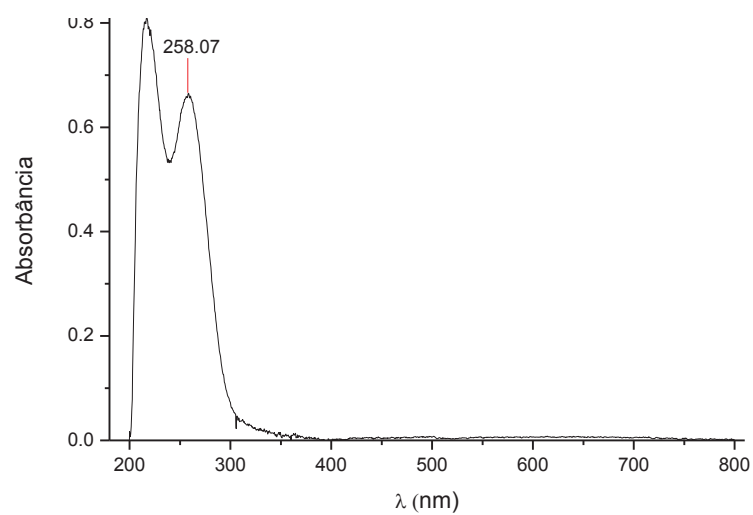
APÊNDICE 15 - Espectro de Massas da Substância 2



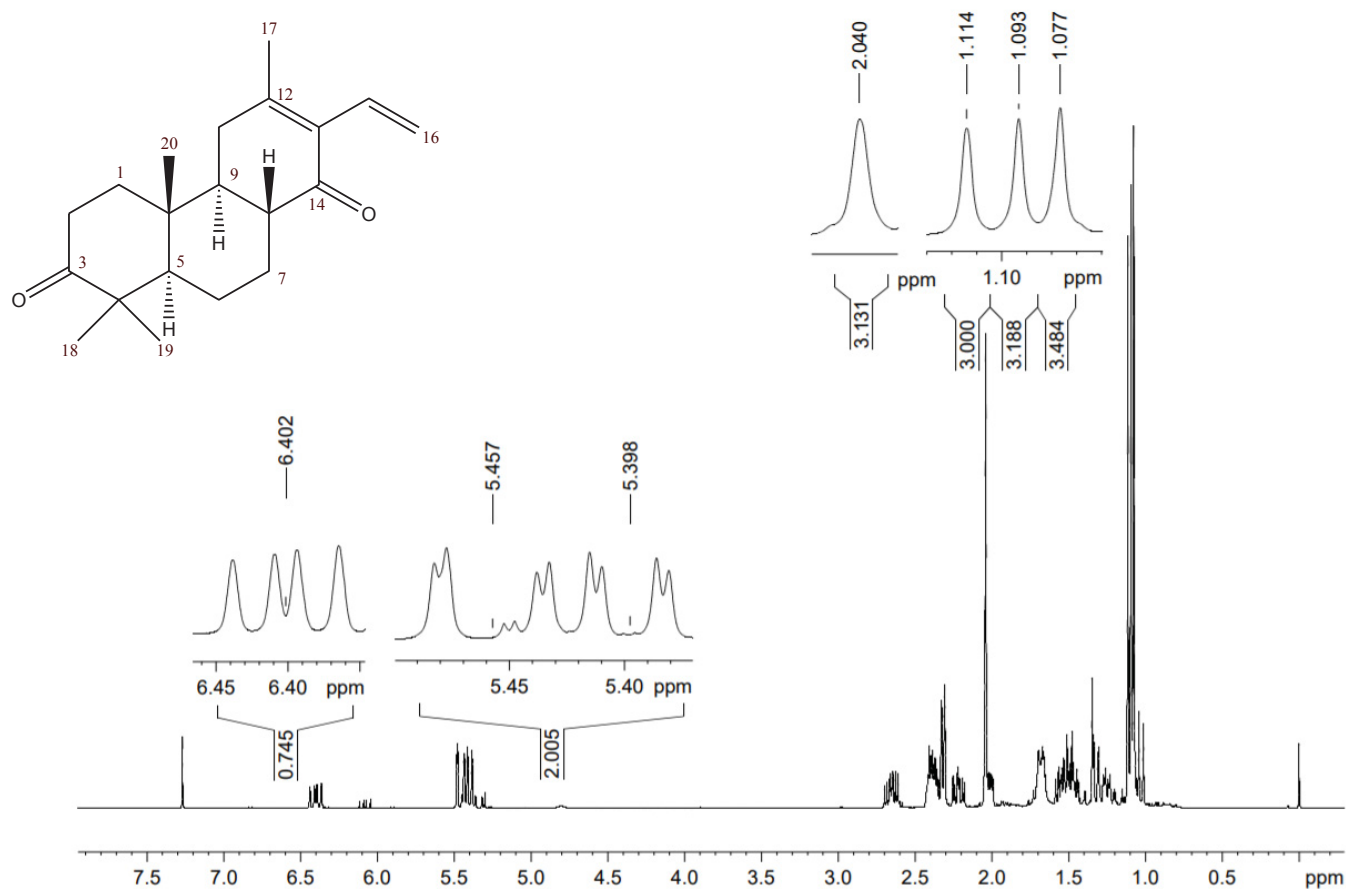
APÊNDICE 16 - Espectro de Infravermelho da Substância 2



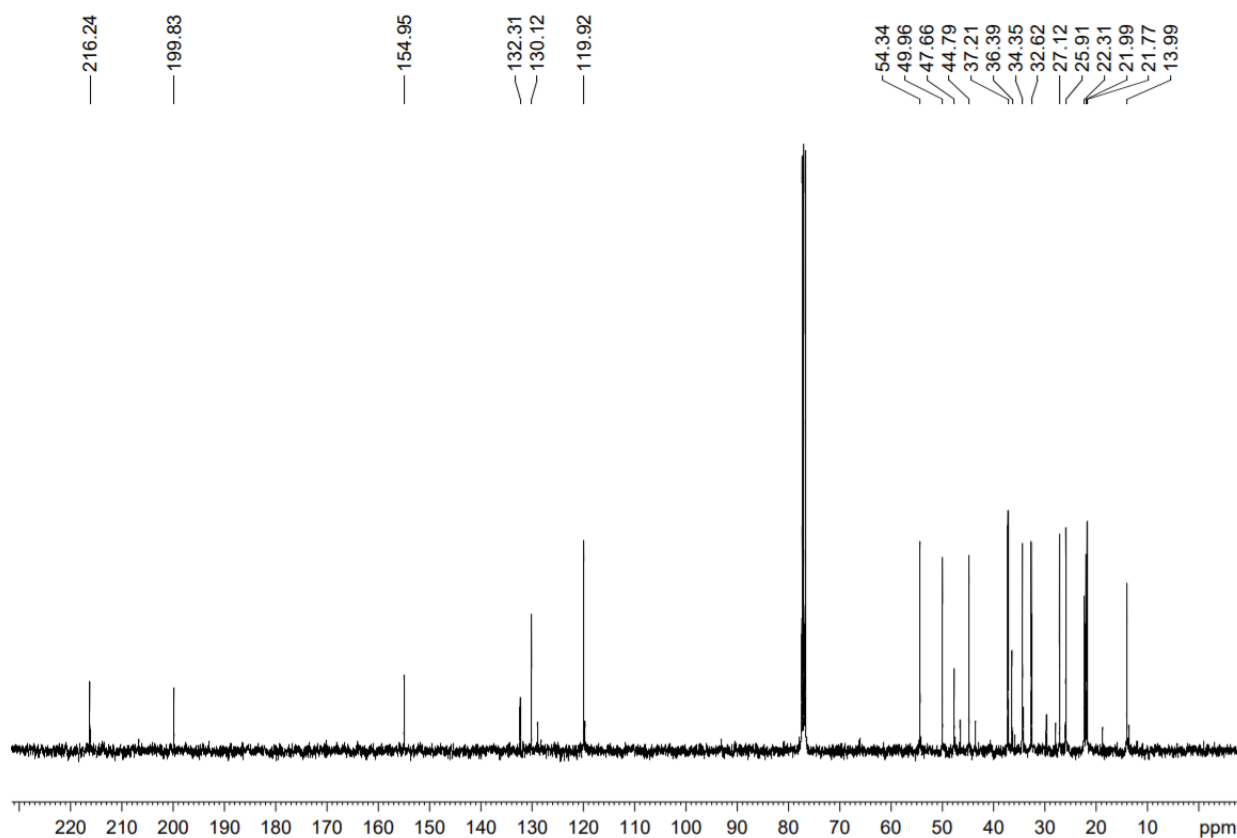
APÊNDICE 17 - Espectro UV-vis da Substância 2

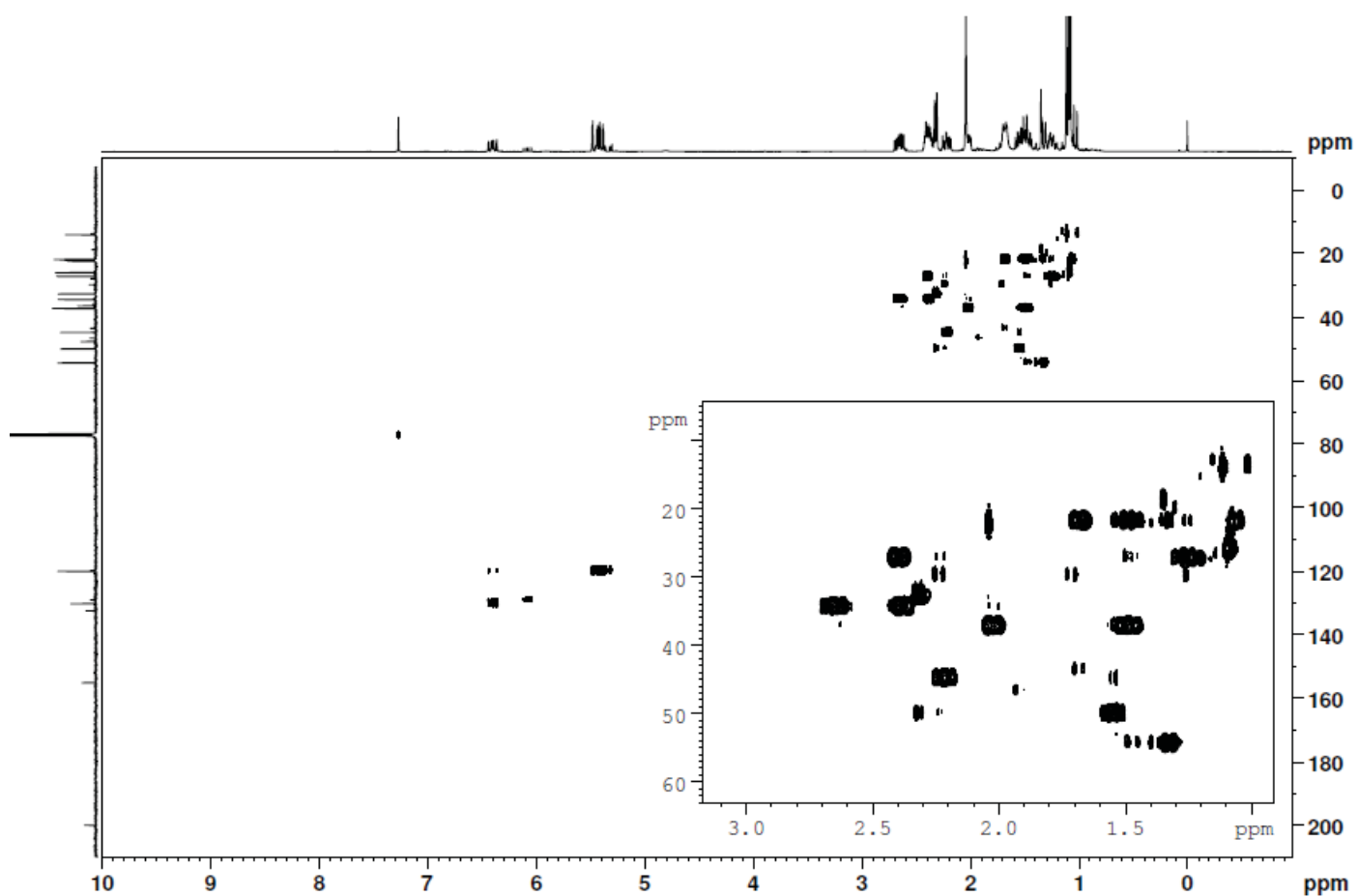
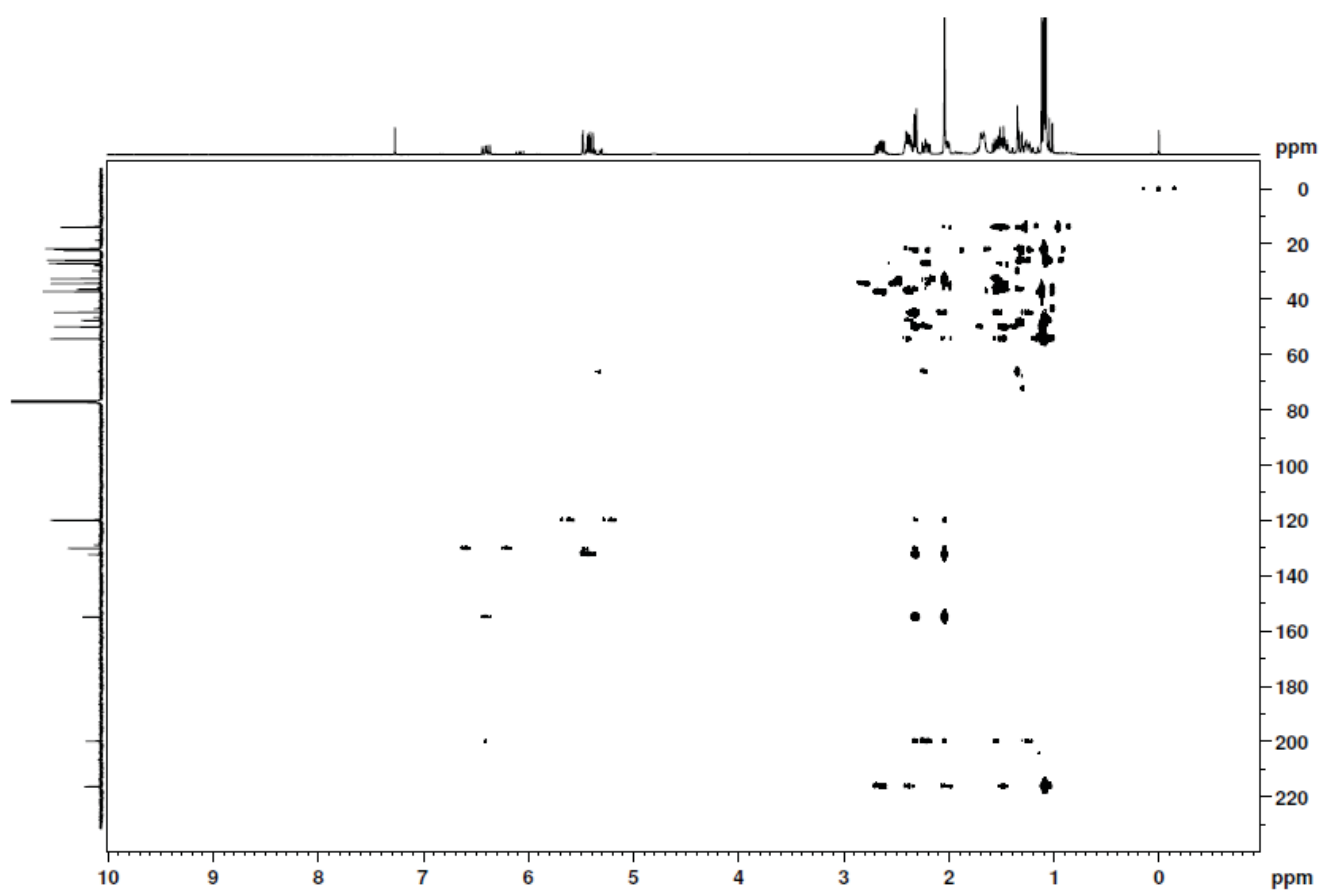


APÊNDICE 18 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância 2

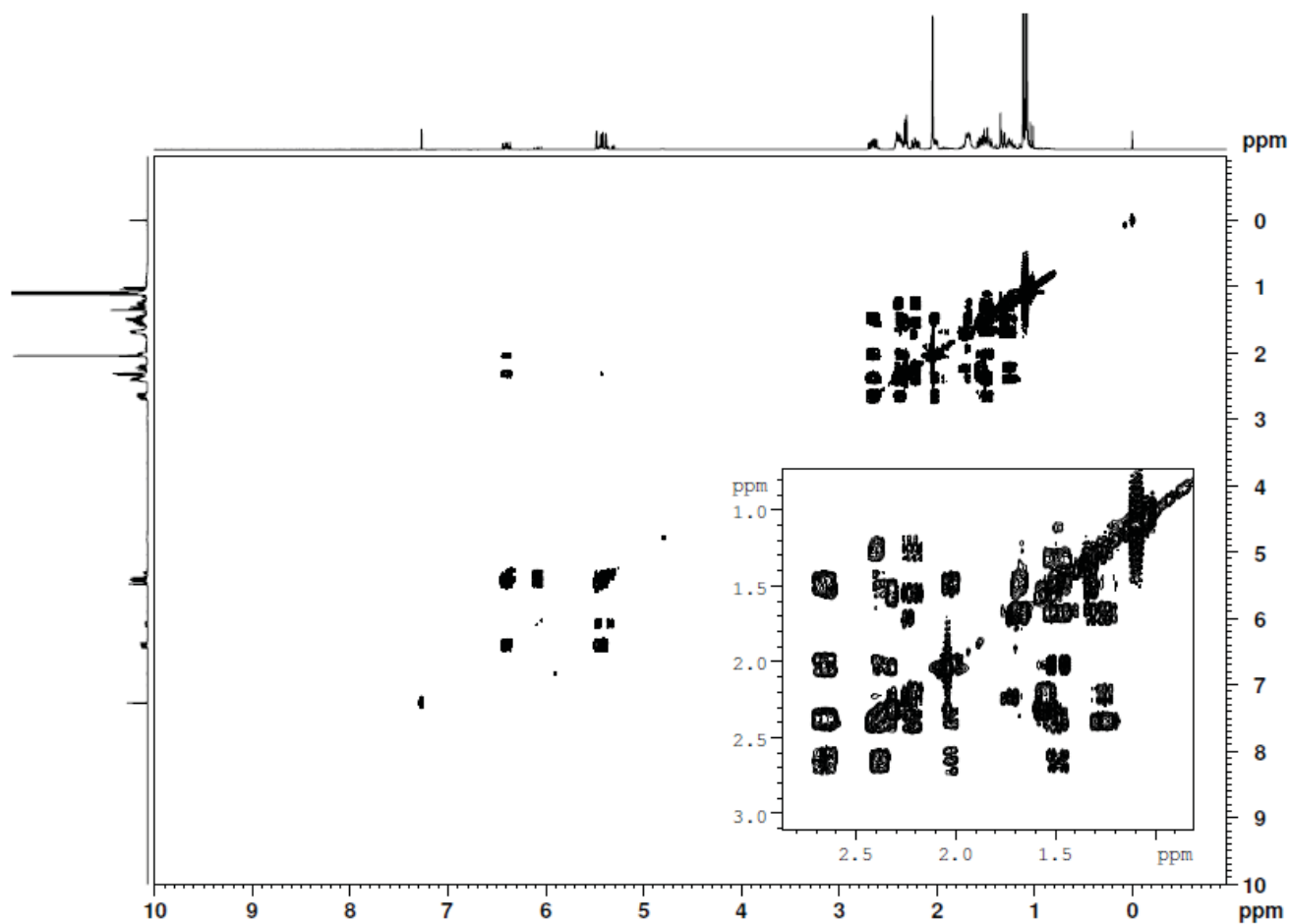


APÊNDICE 19 - Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 2

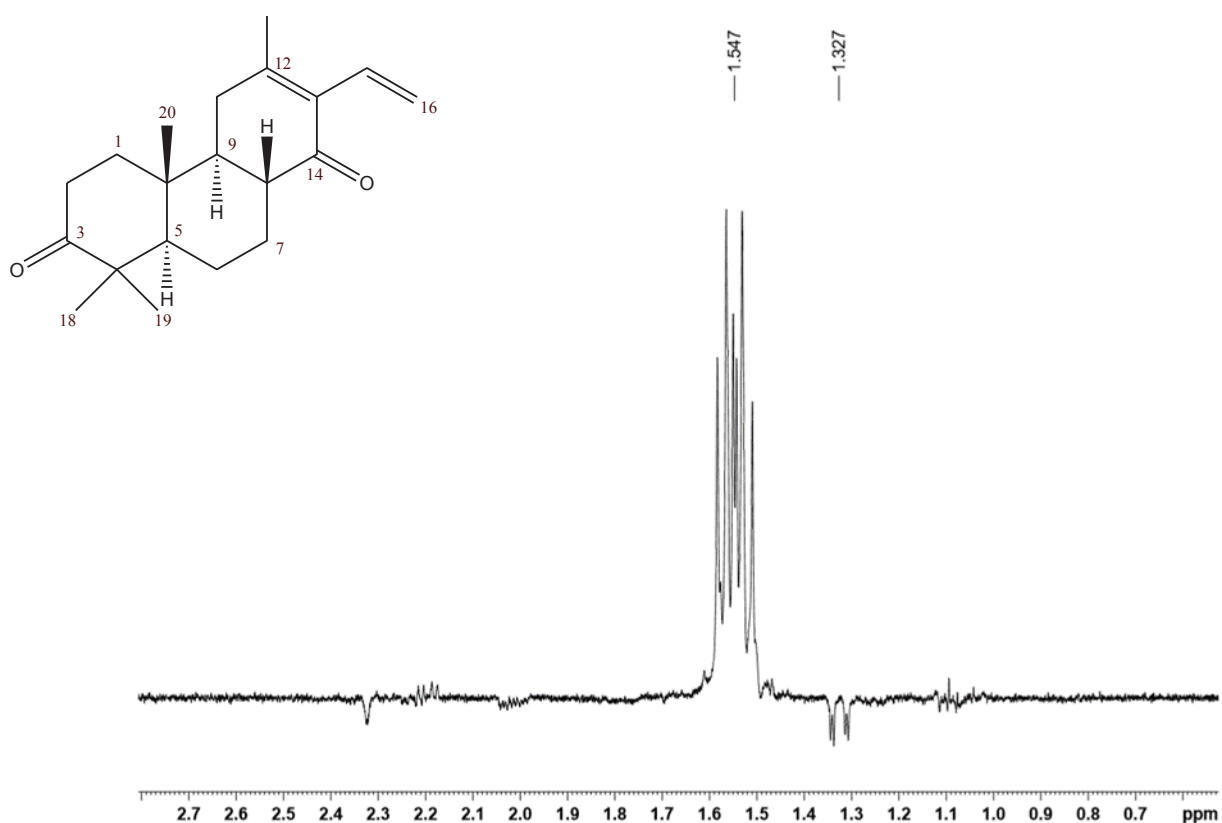


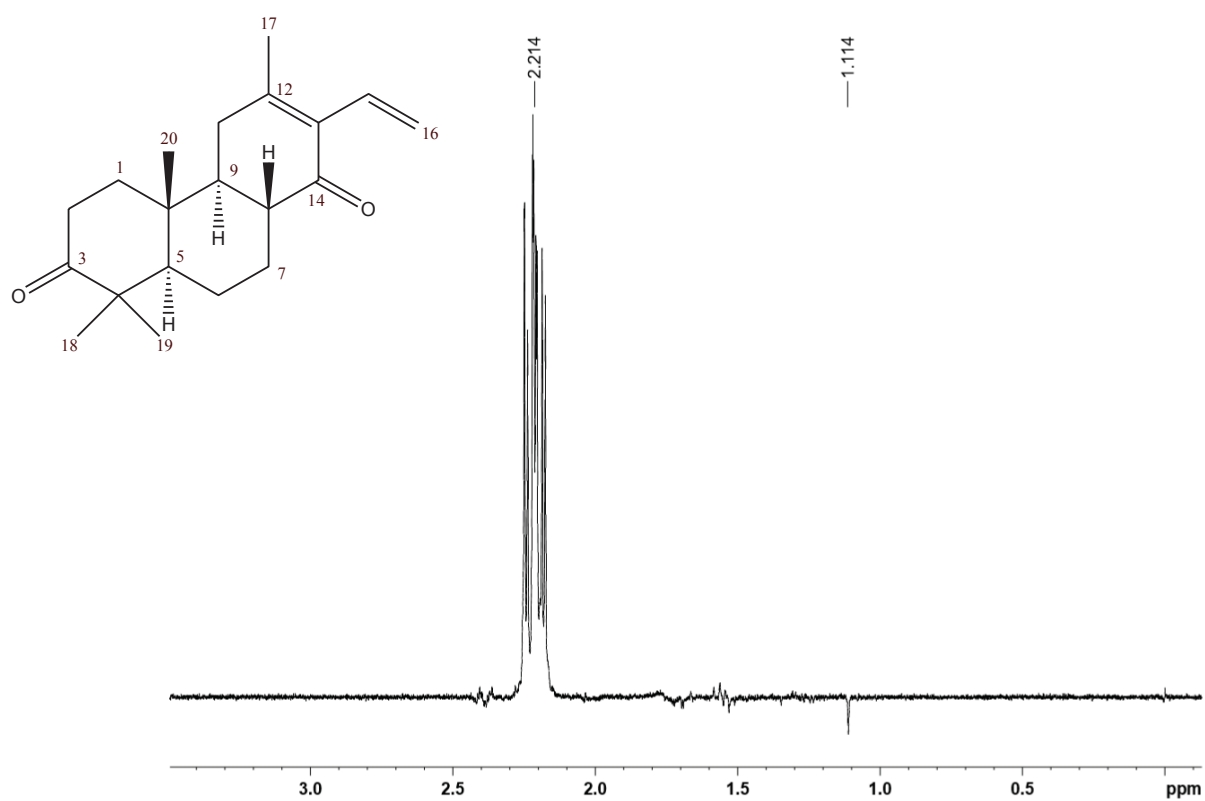
APÊNDICE 20 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 2APÊNDICE 21 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 2

APÊNDICE 22 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 2

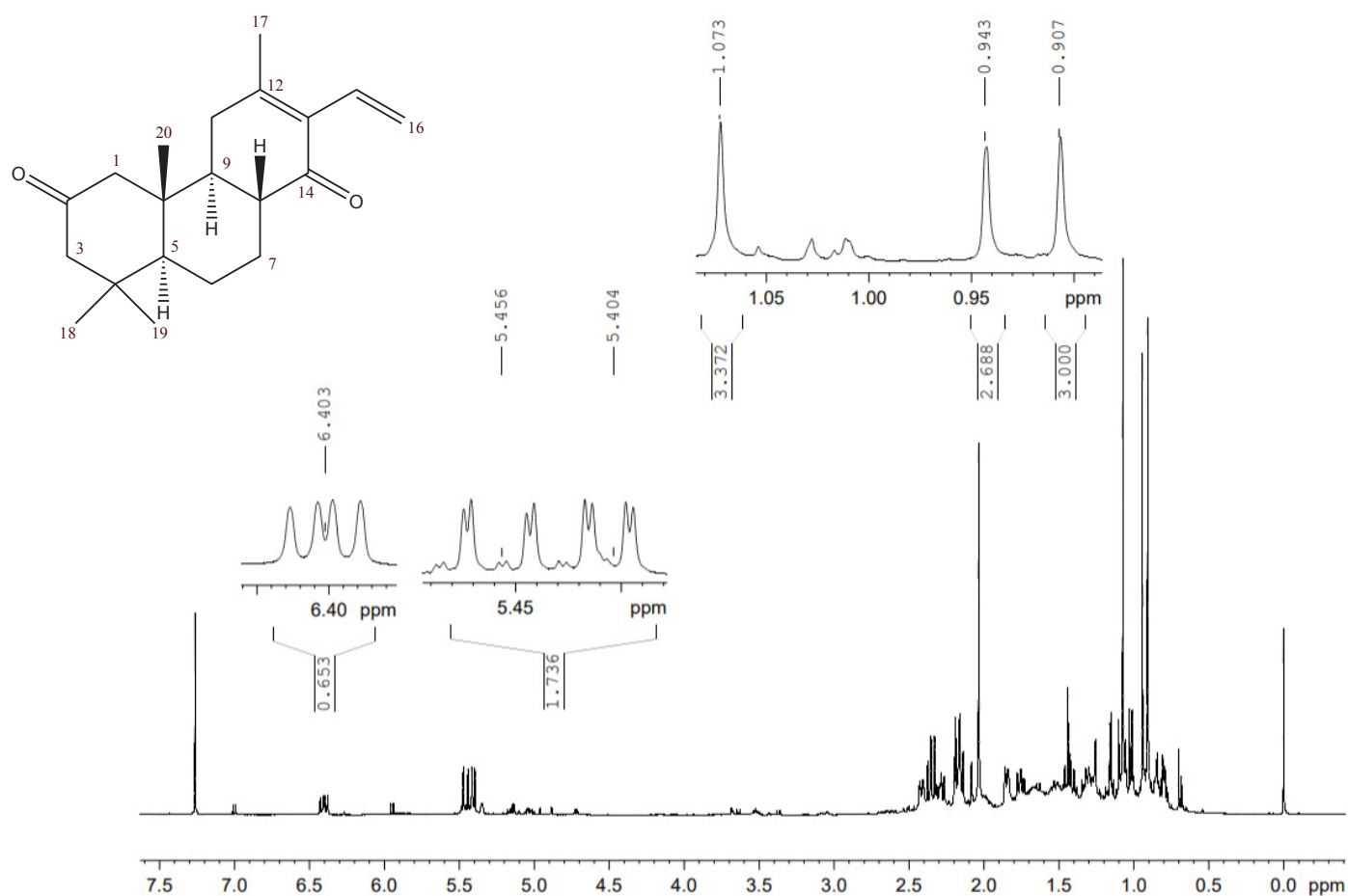


APÊNDICE 23 - Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) da Substância 2

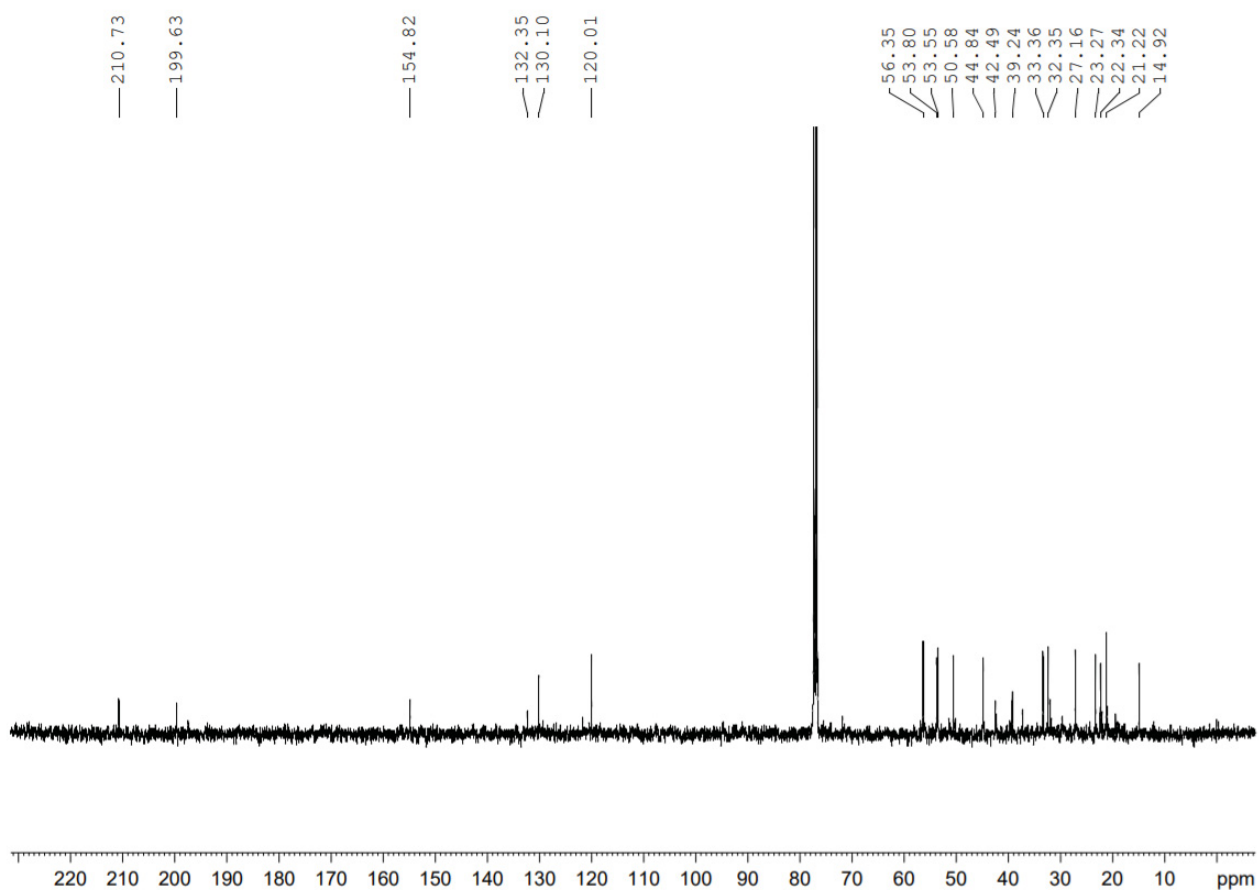


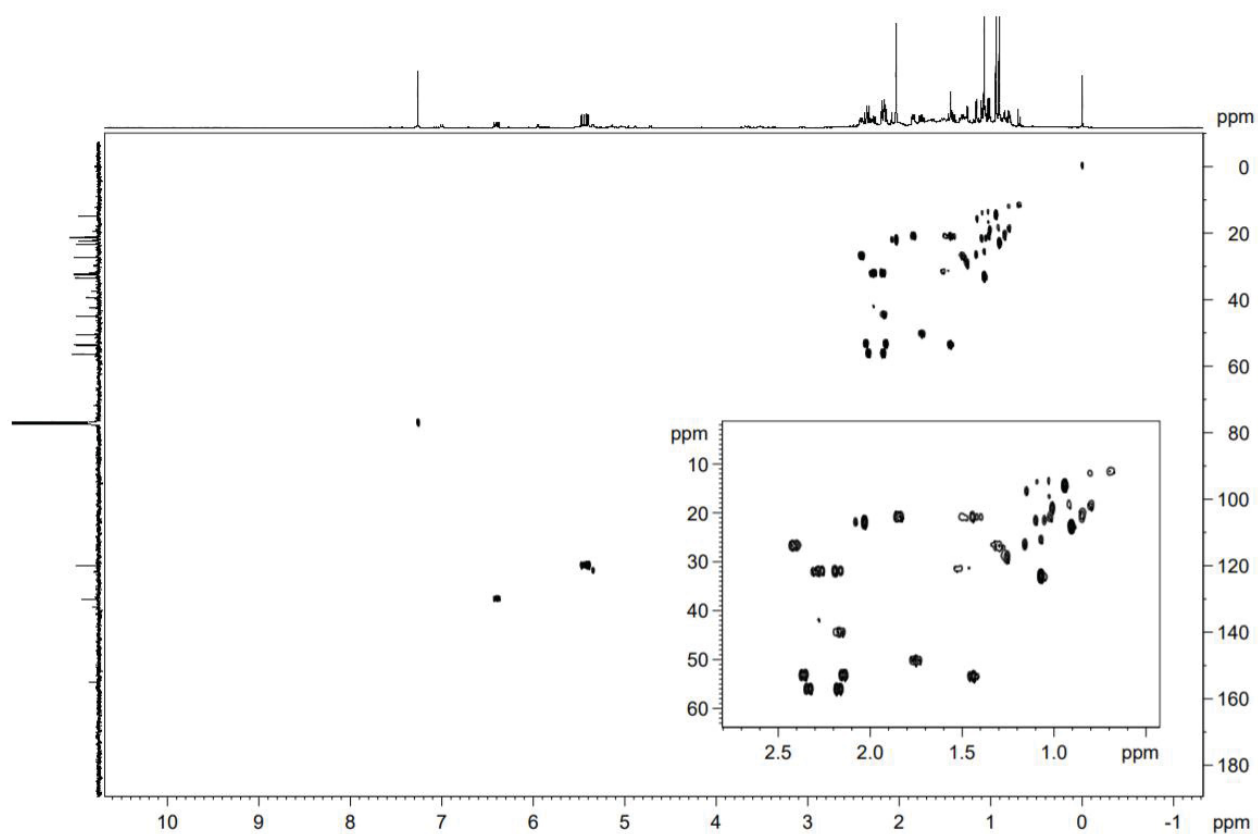
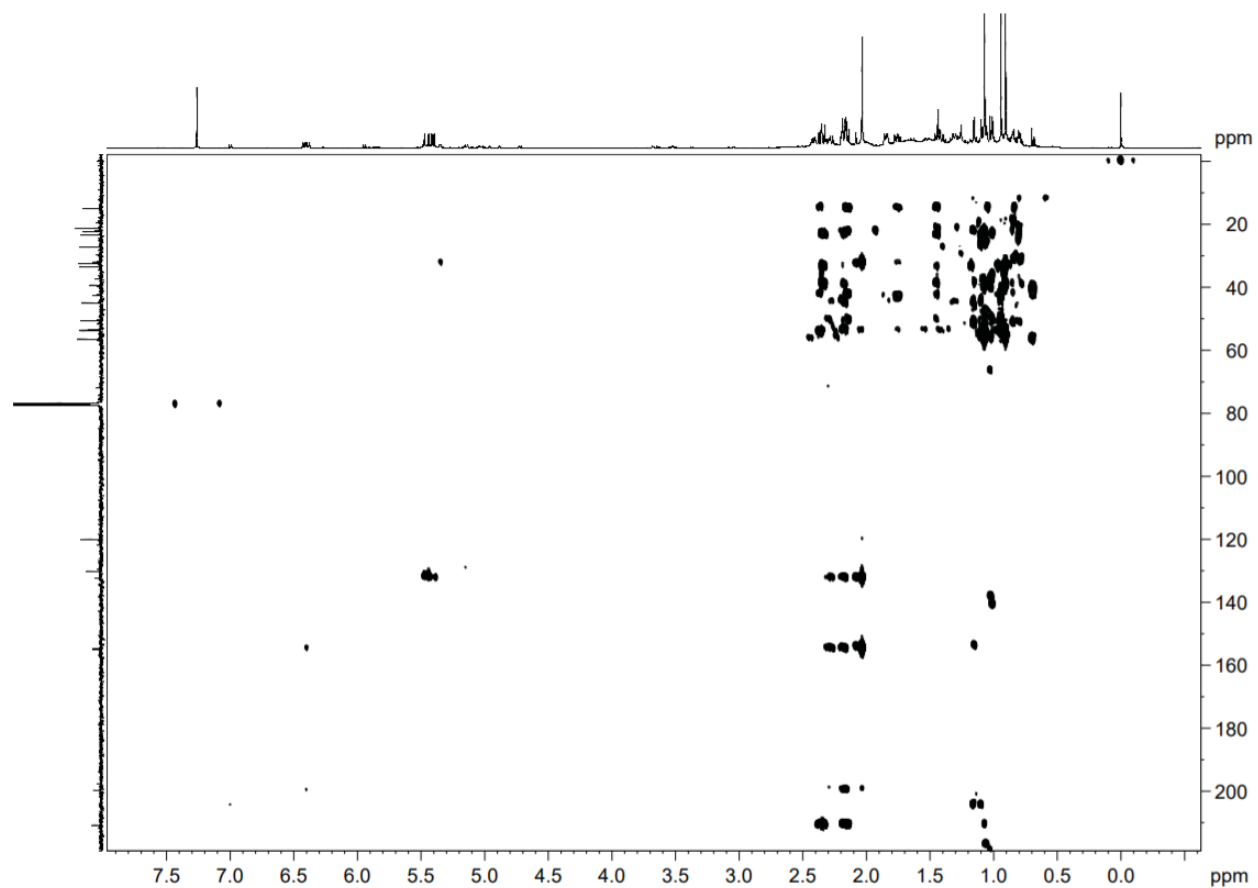
APÊNDICE 24 - Espectro de NOE (400 MHz, CDCl₃) da Substância 2

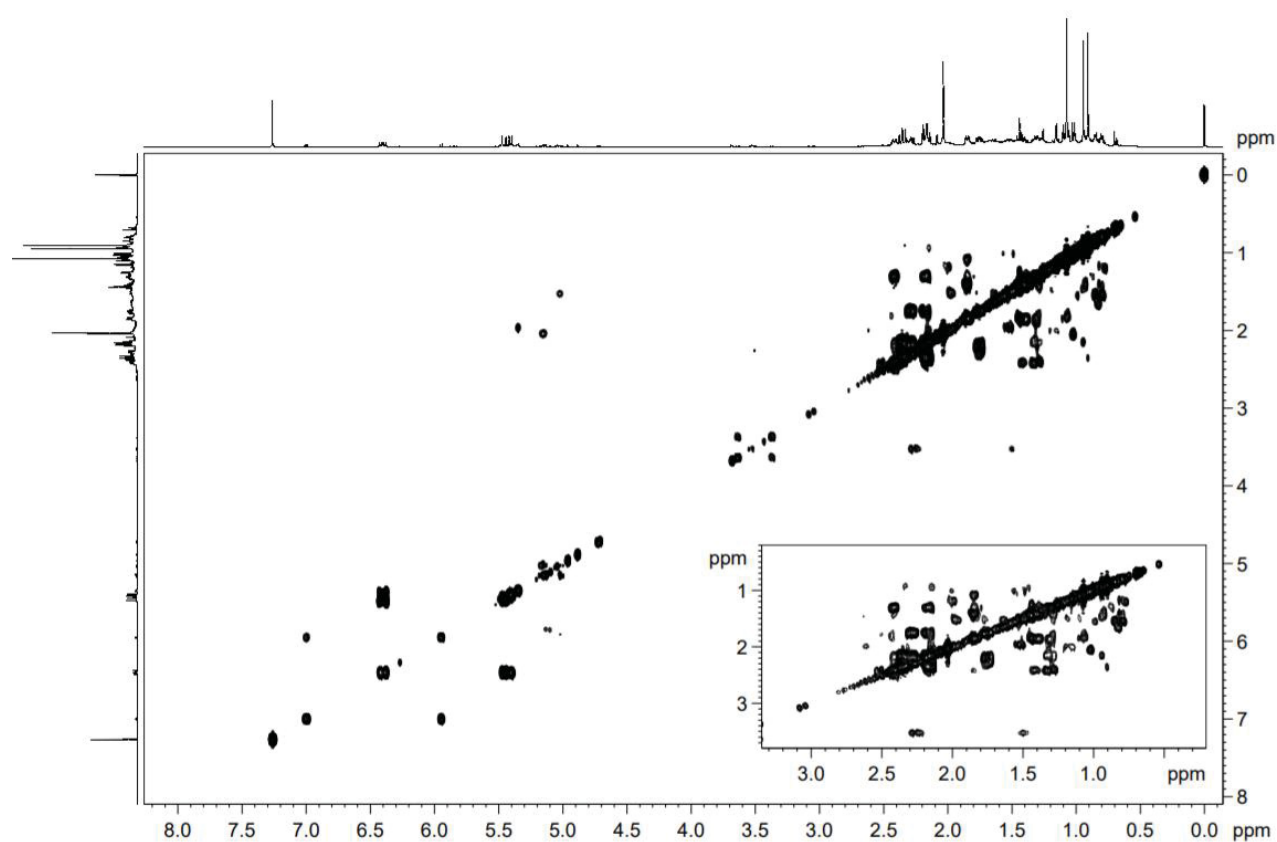
APÊNDICE 25 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da Substância **3**



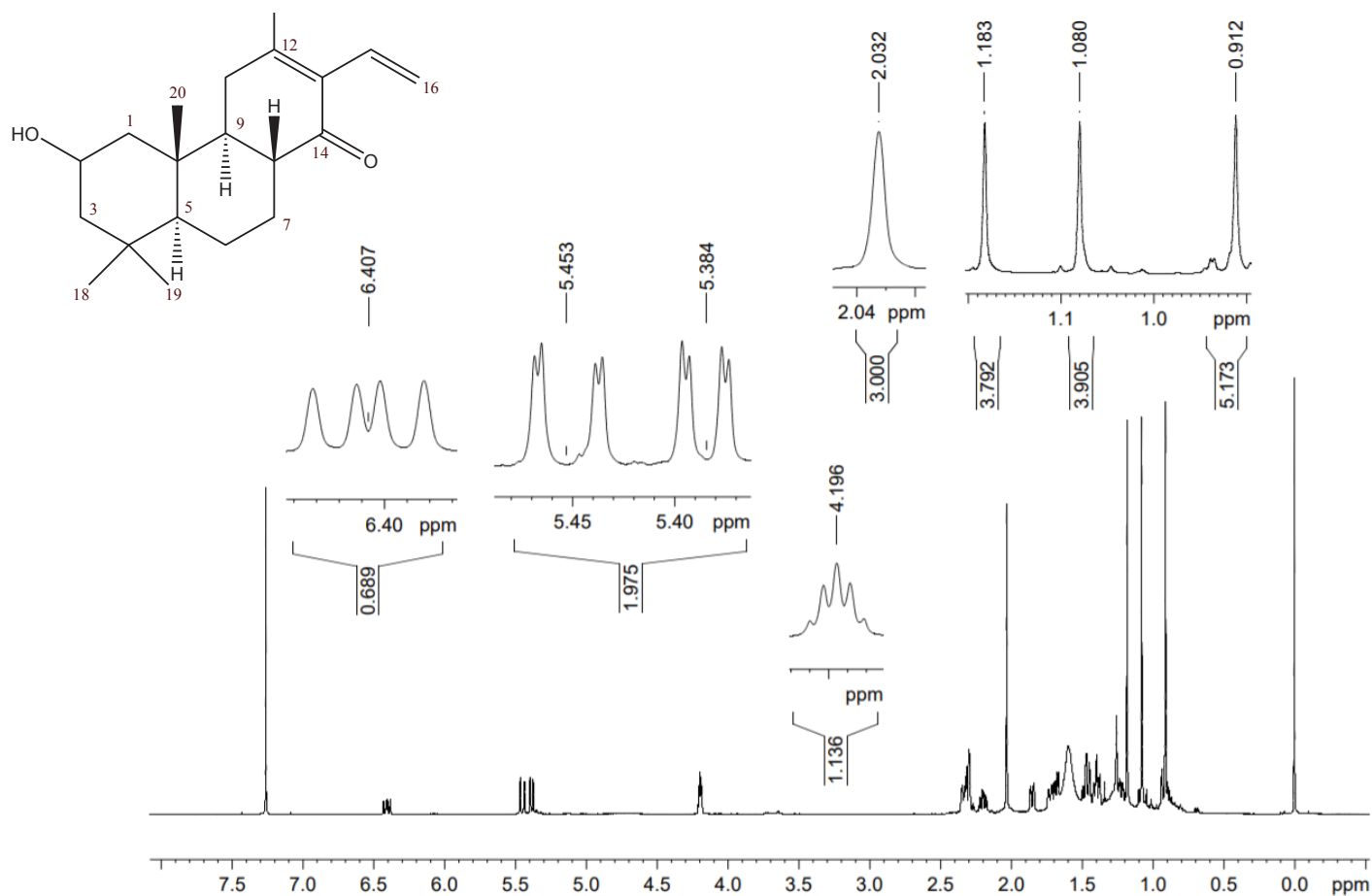
APÊNDICE 26 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância **3**



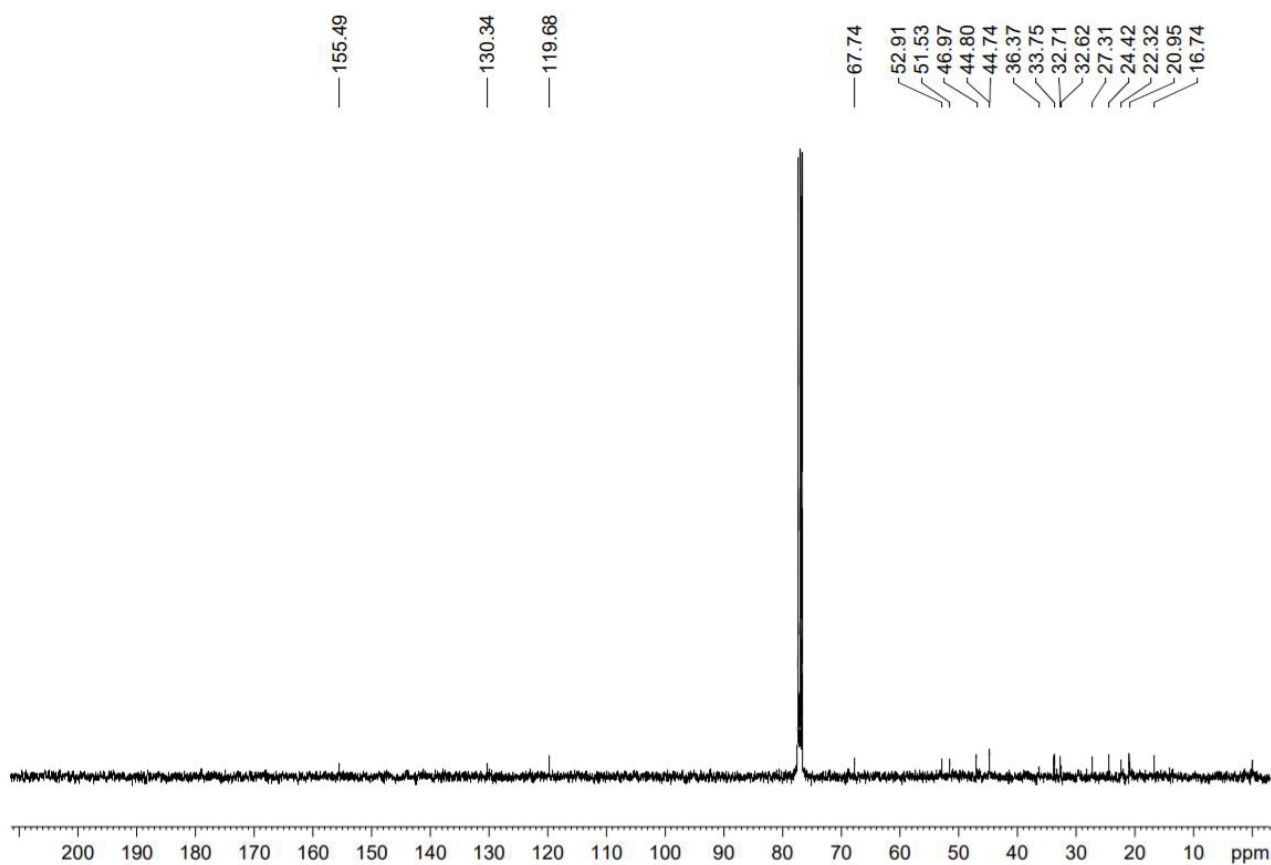
APÊNDICE 27 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **3**APÊNDICE 28 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **3**

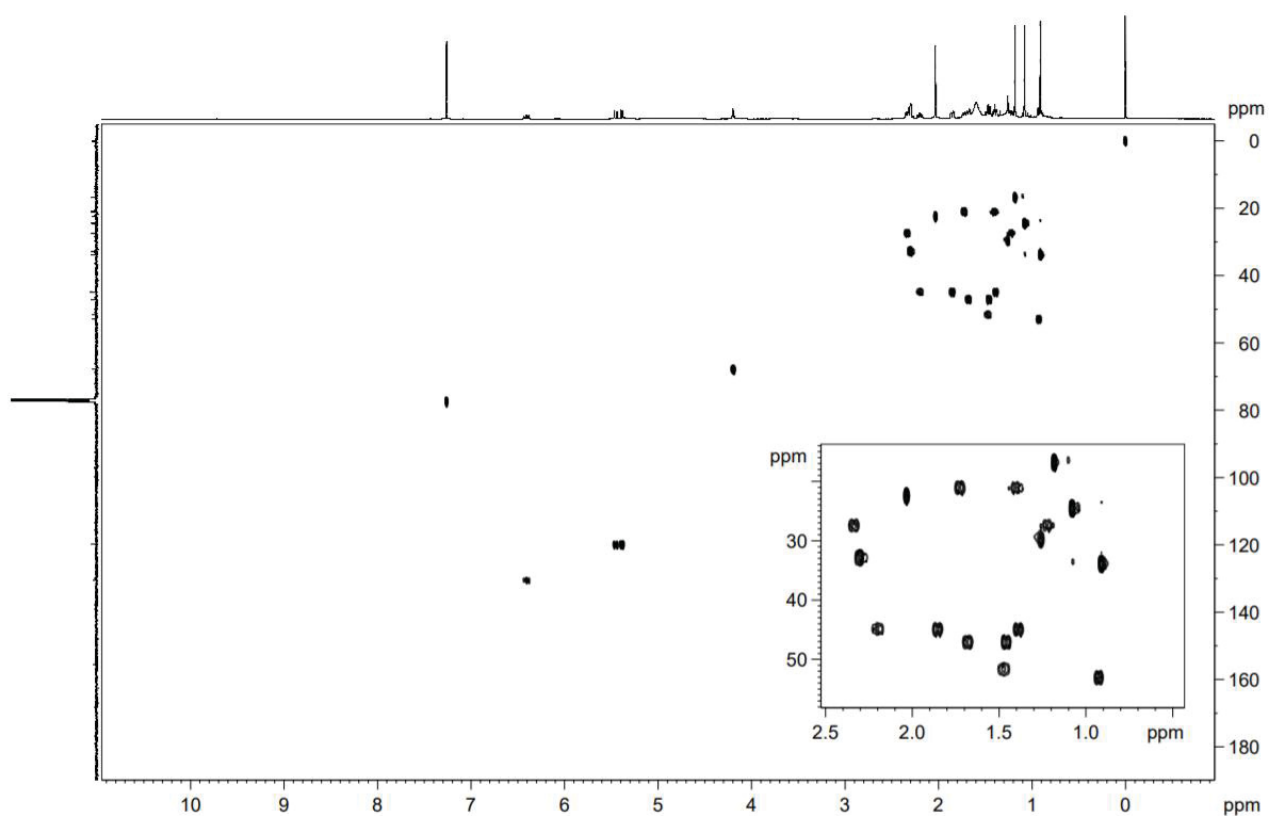
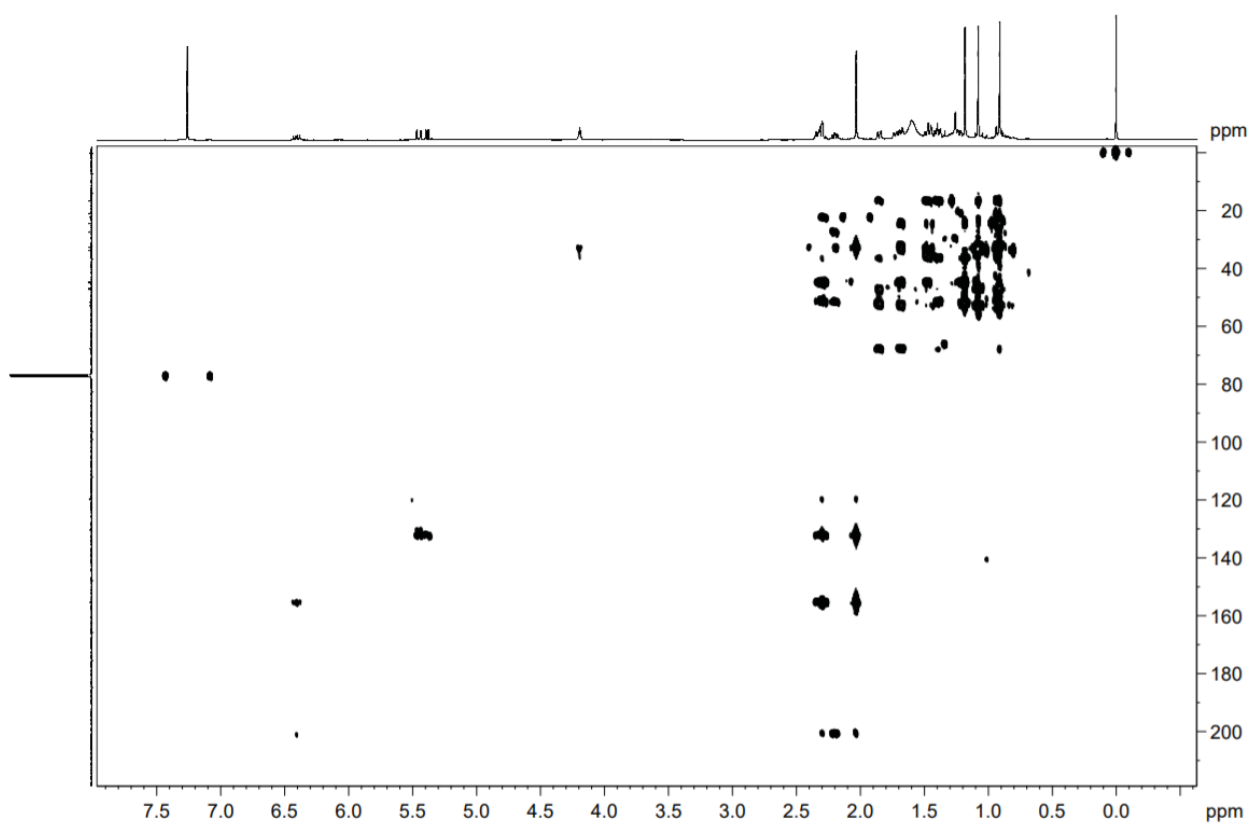
APÊNDICE 29 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **3**

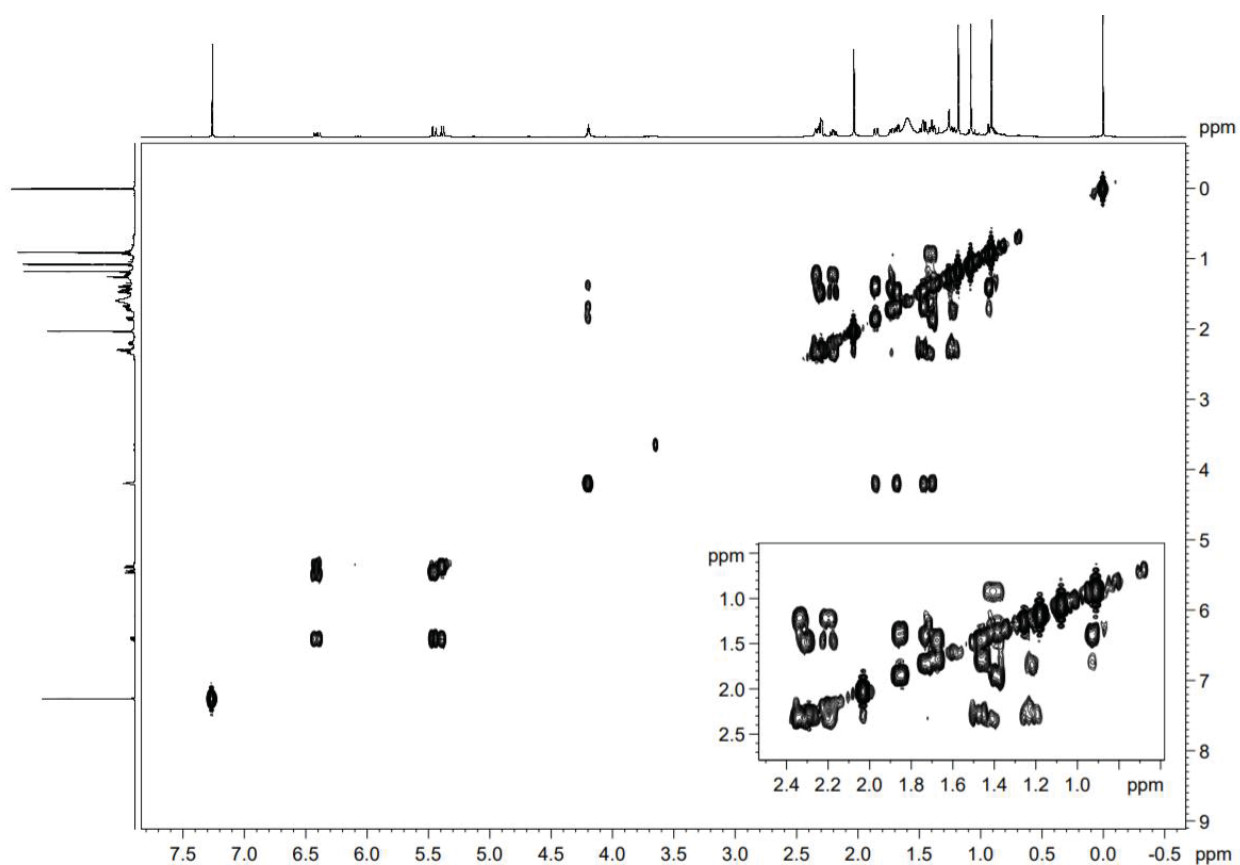
APÊNDICE 30 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da Substância 4



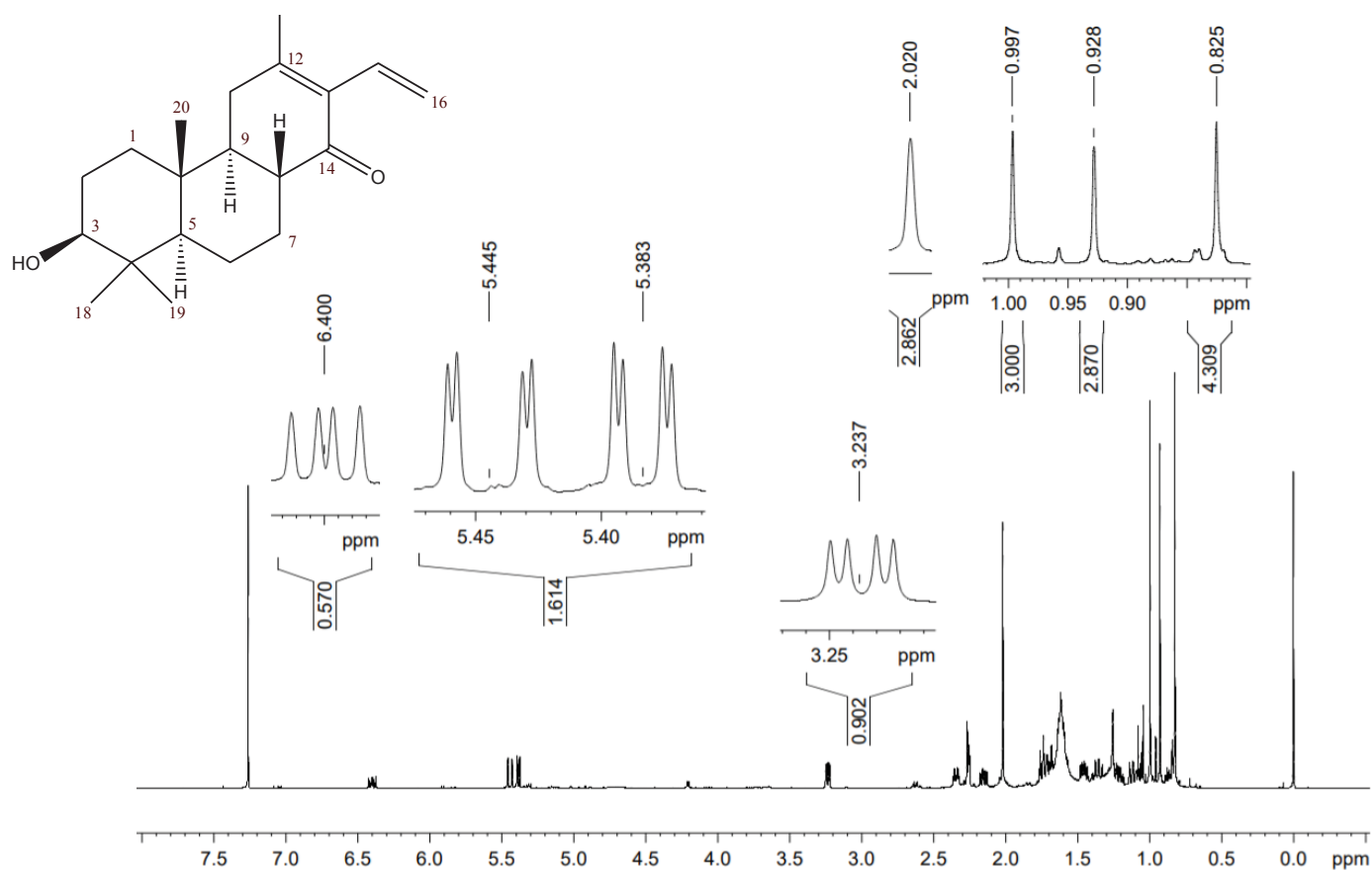
APÊNDICE 31 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância 4



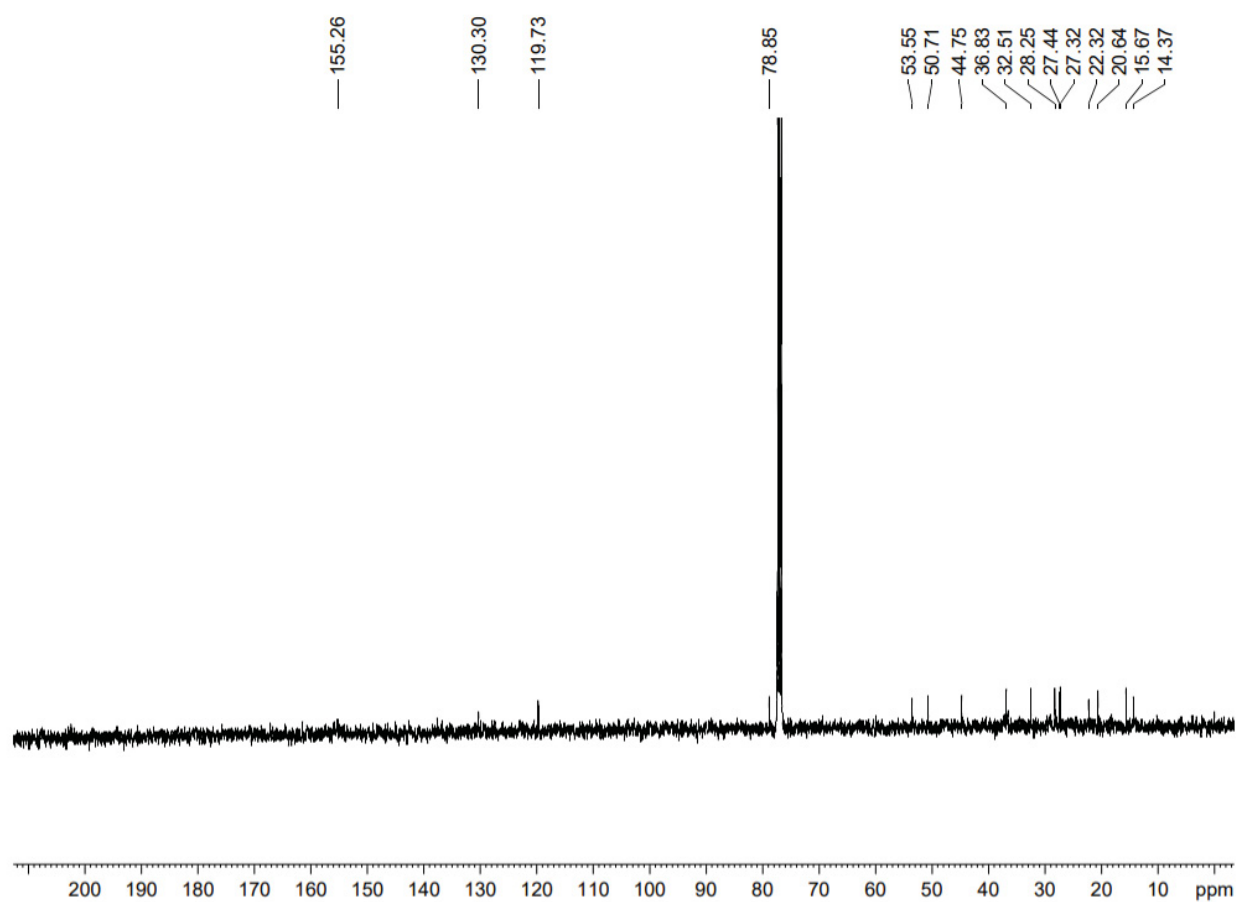
APÊNDICE 32 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância 4APÊNDICE 33 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância 4

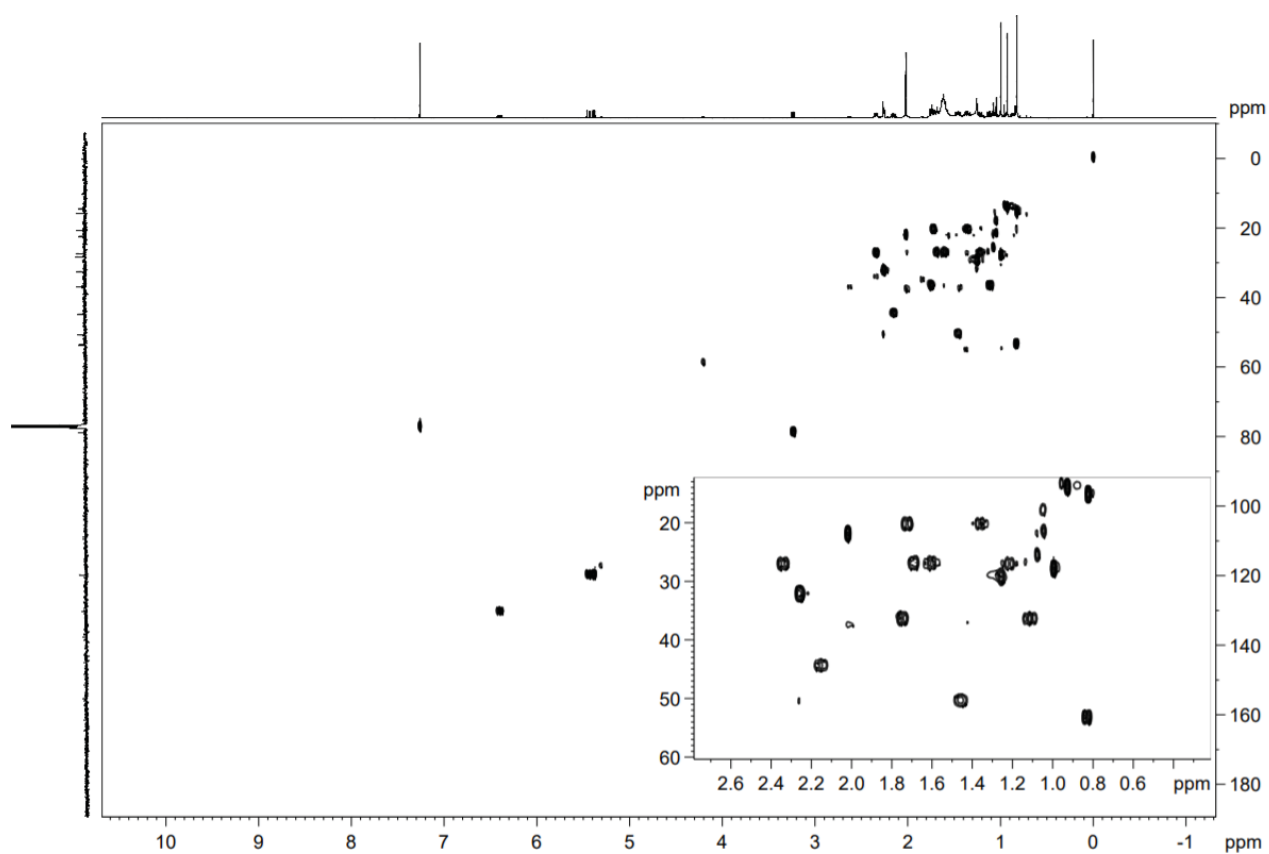
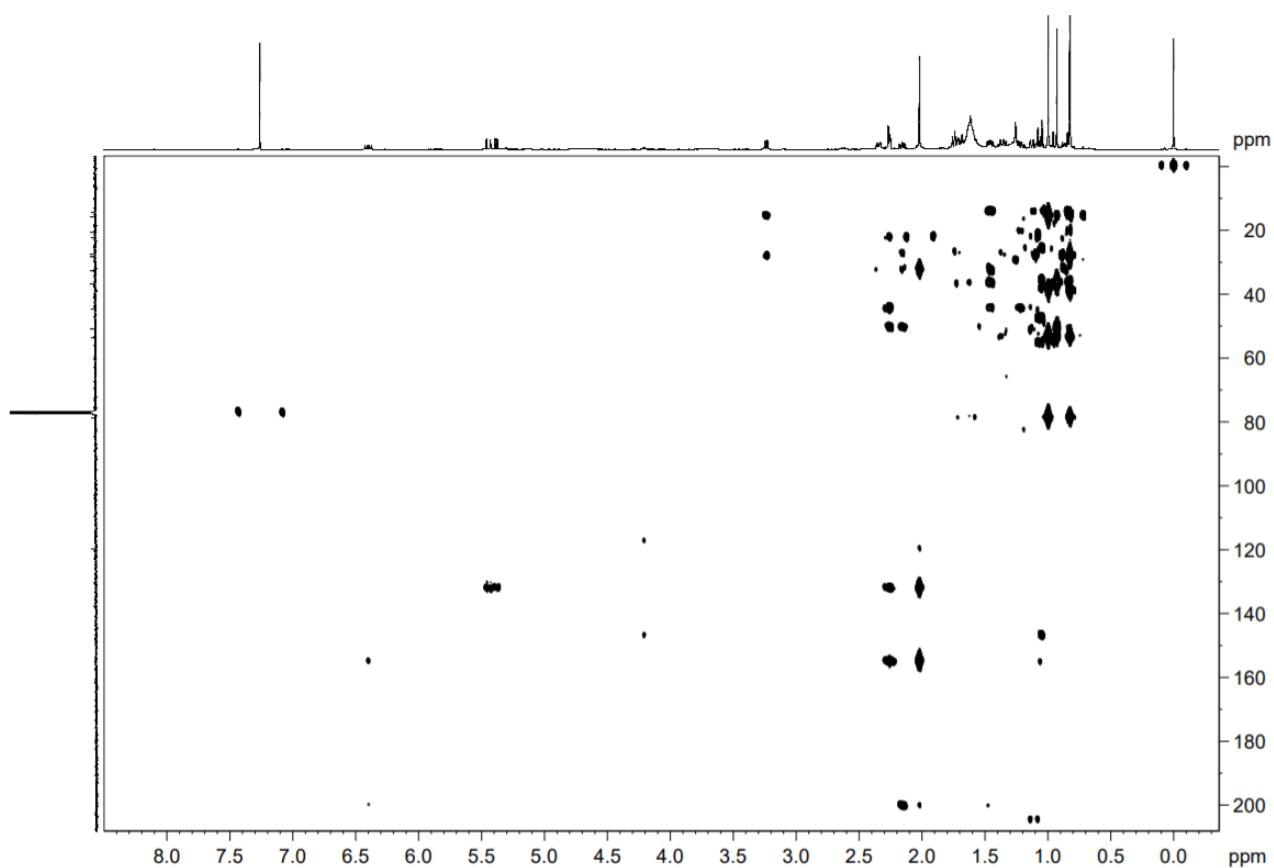
APÊNDICE 34 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 600 MHz, CDCl_3) da Substância 4

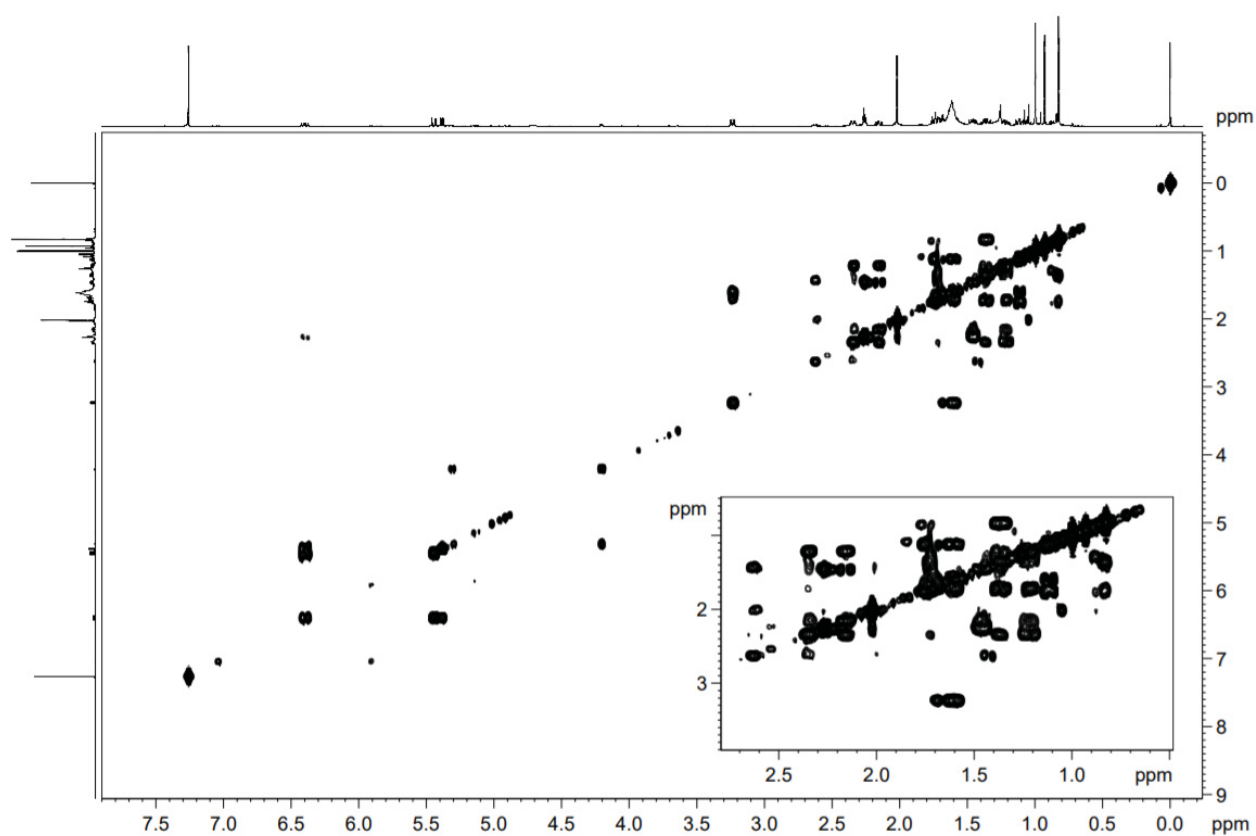
APÊNDICE 35 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da Substância **5**

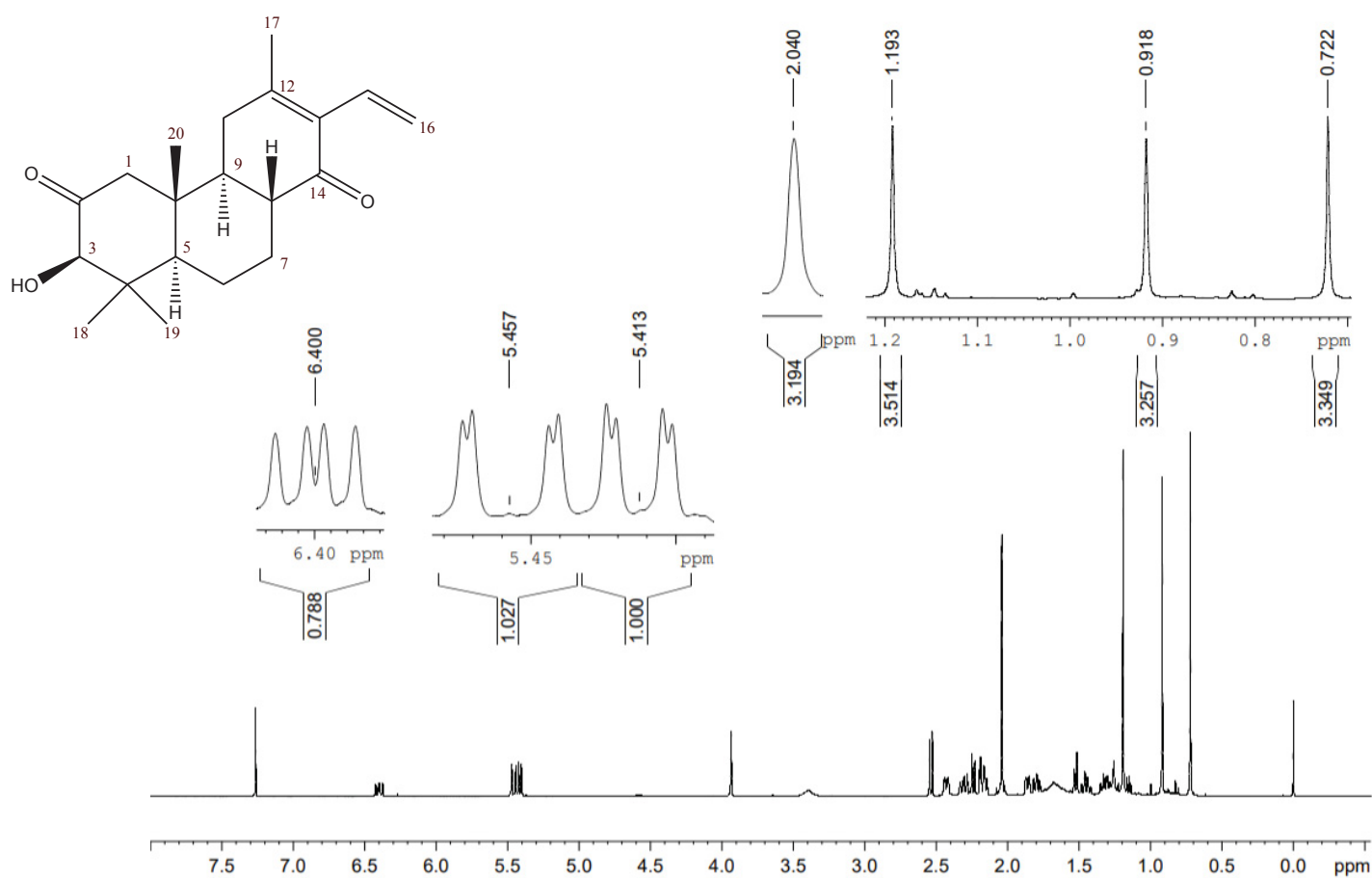
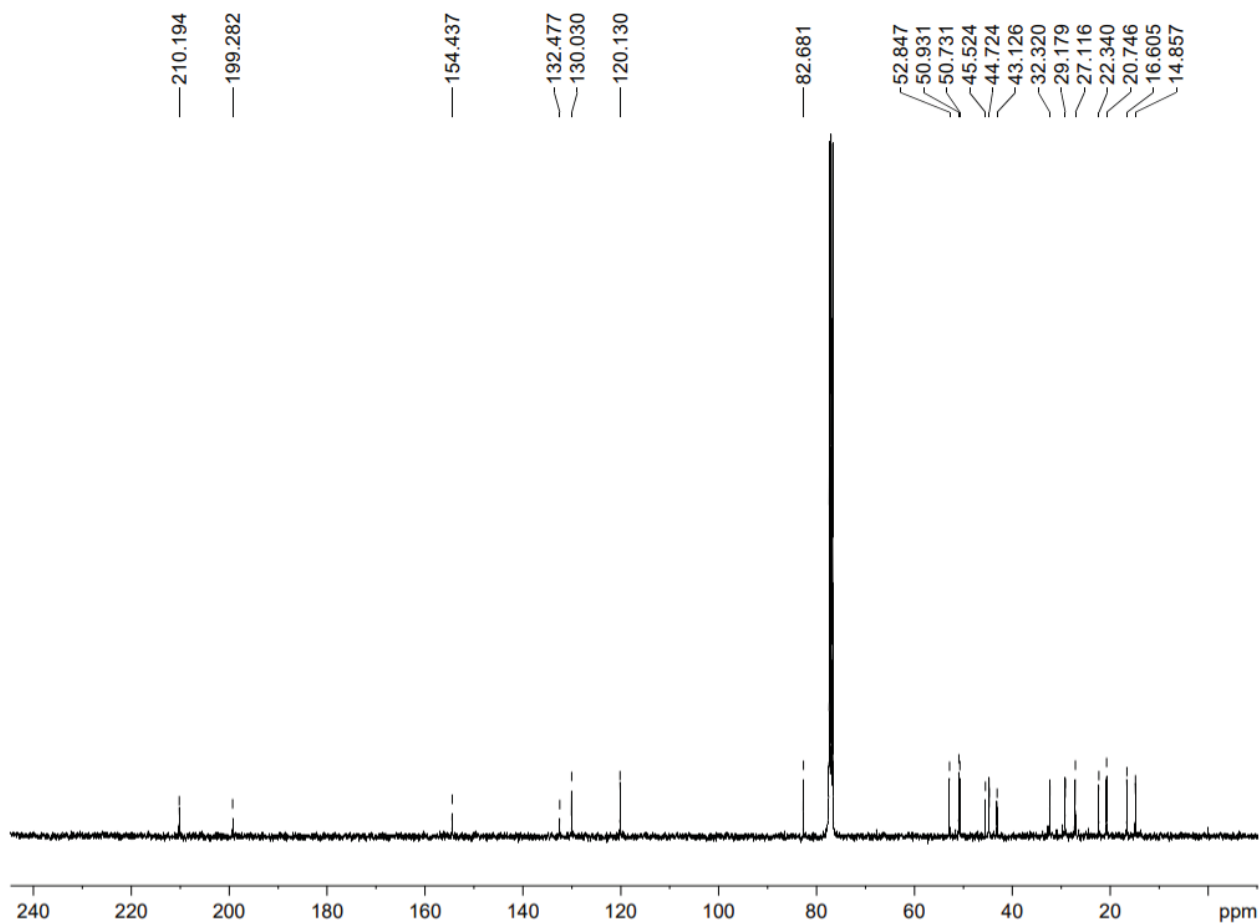


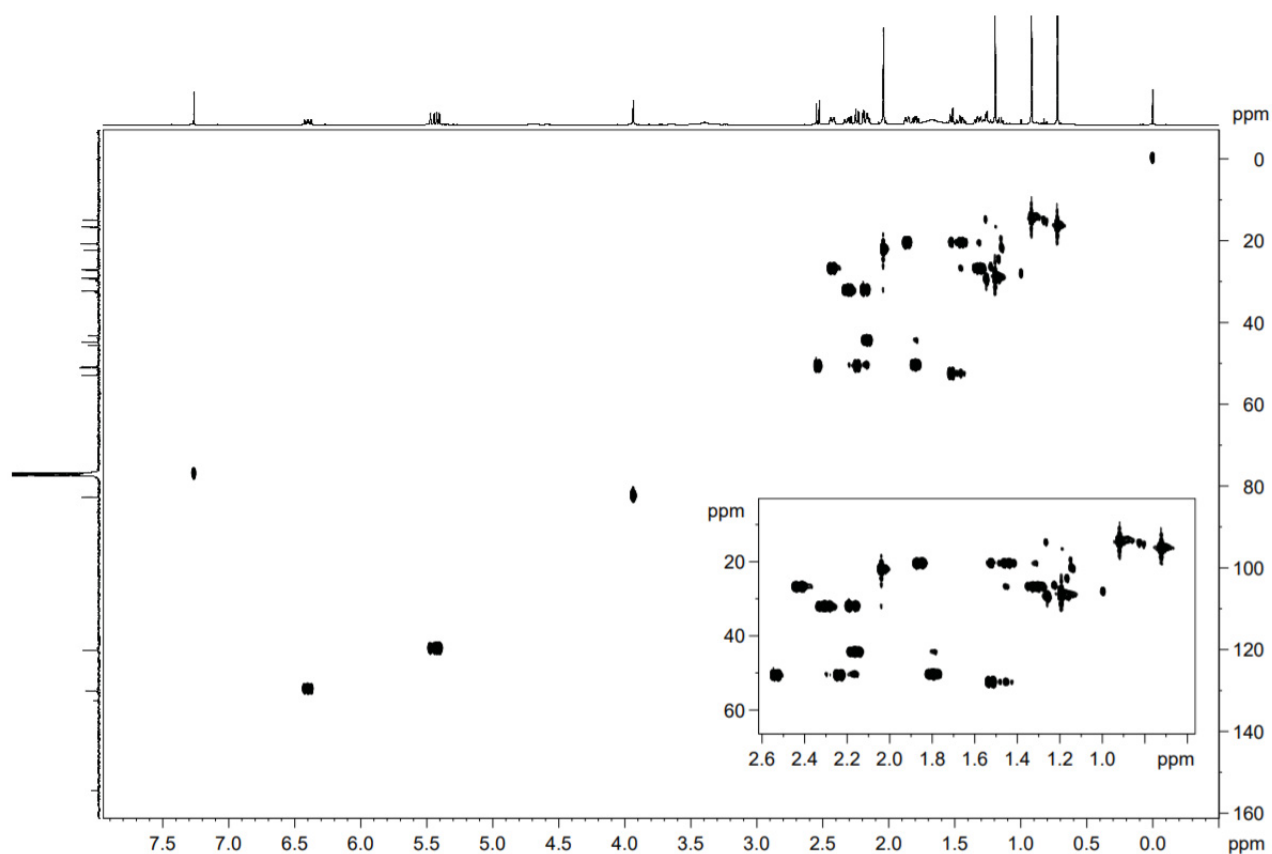
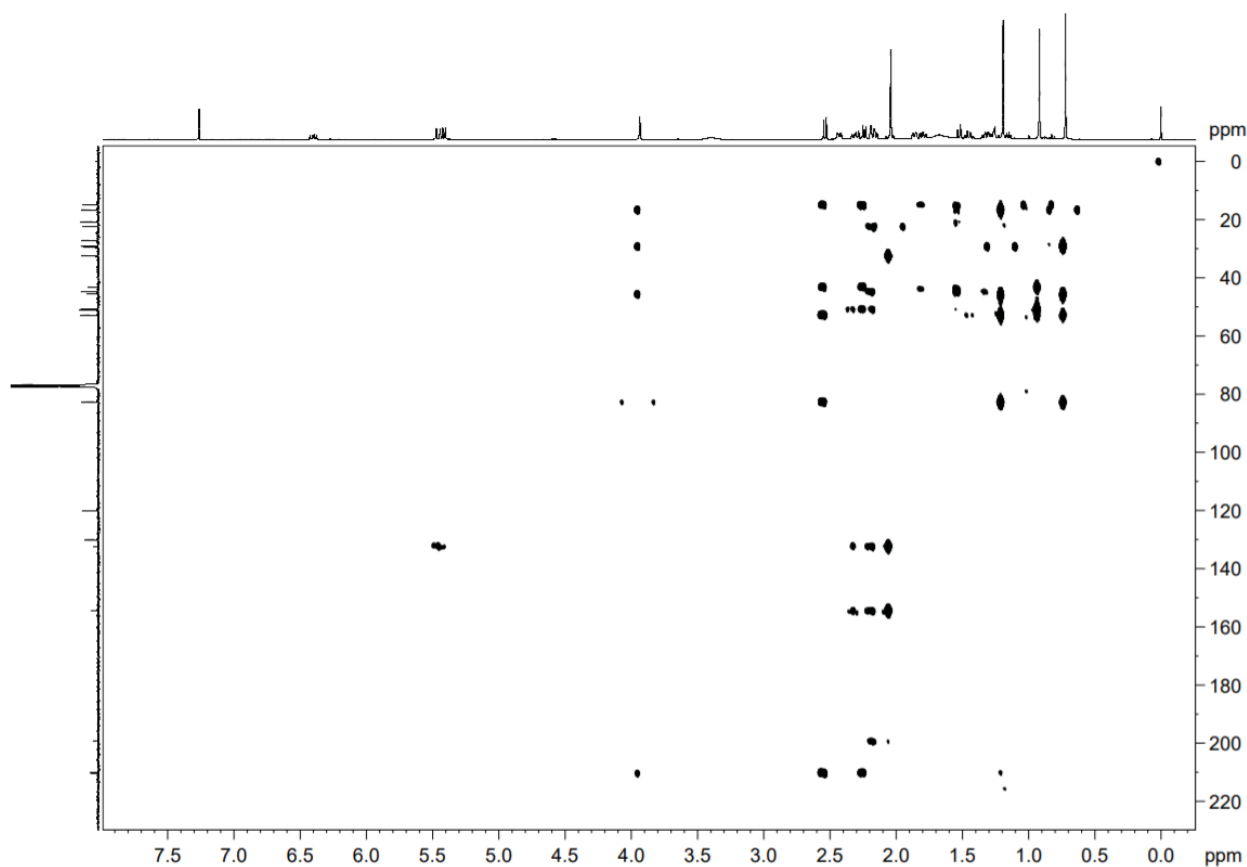
APÊNDICE 36 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância **5**

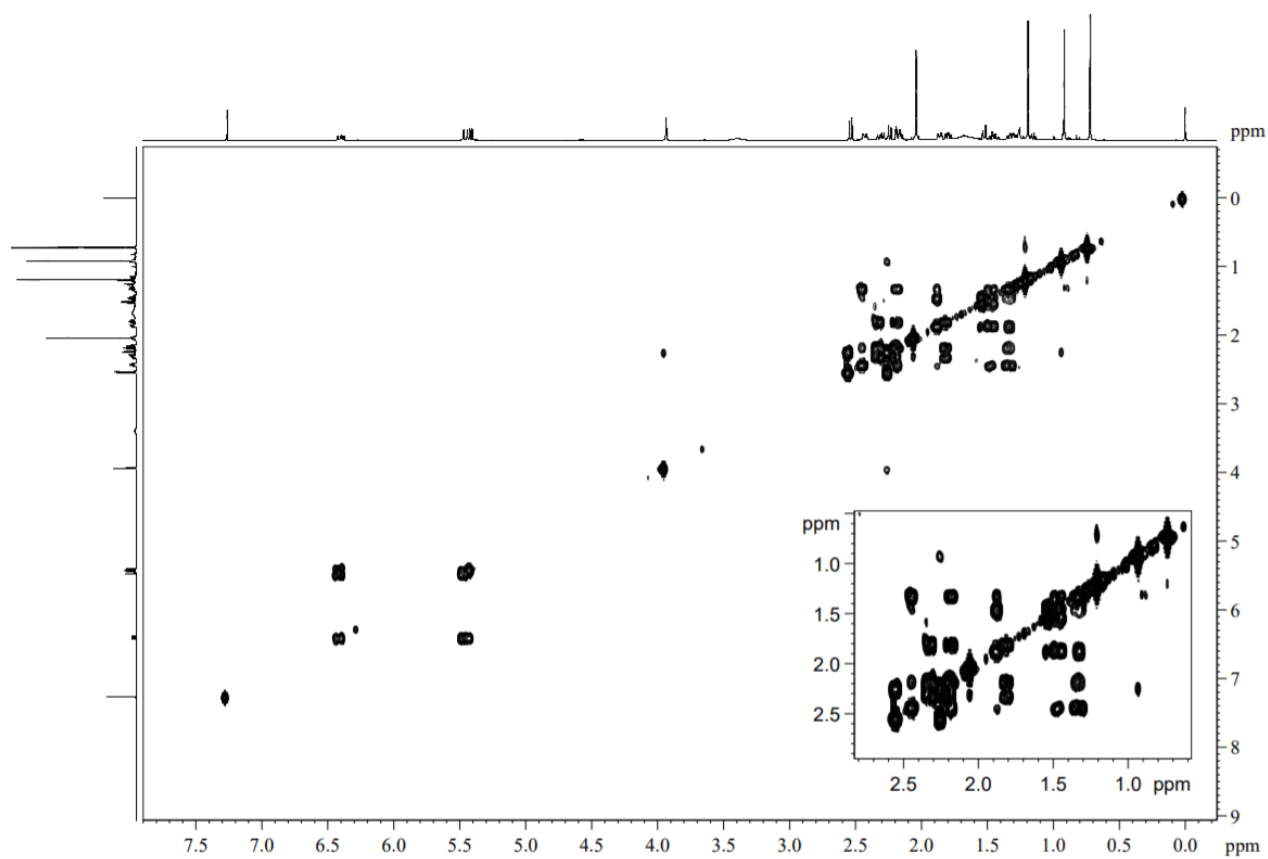


APÊNDICE 37 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **5**APÊNDICE 38 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **5**

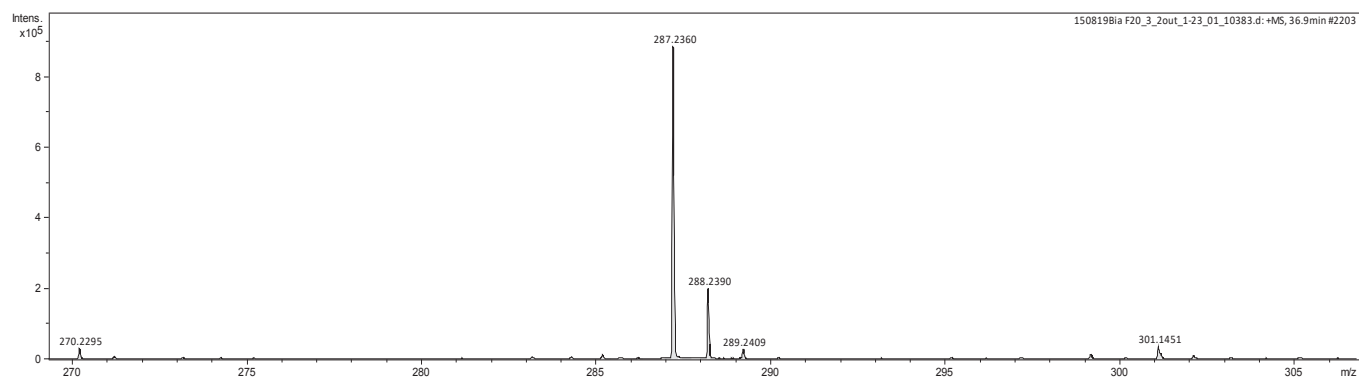
APÊNDICE 39 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **5**

APÊNDICE 40 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da Substância **6**APÊNDICE 41 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância **6**

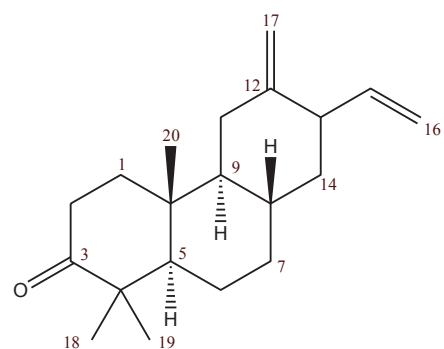
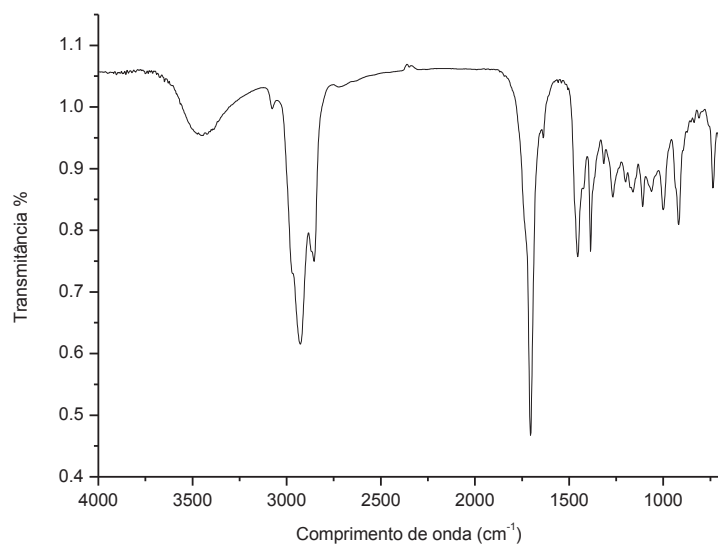
APÊNDICE 42 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **6**APÊNDICE 43 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **6**

APÊNDICE 44 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 600 MHz, CDCl_3) da Substância 6

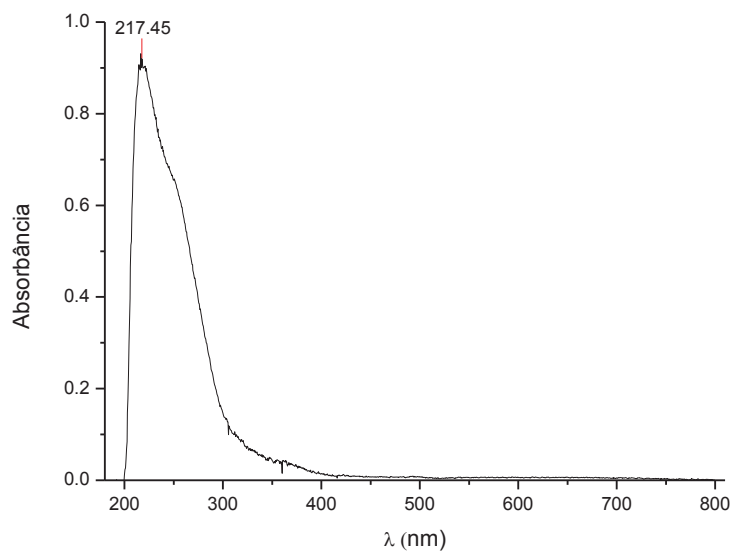
APÊNDICE 45 - Espectro de Massas da Substância 7

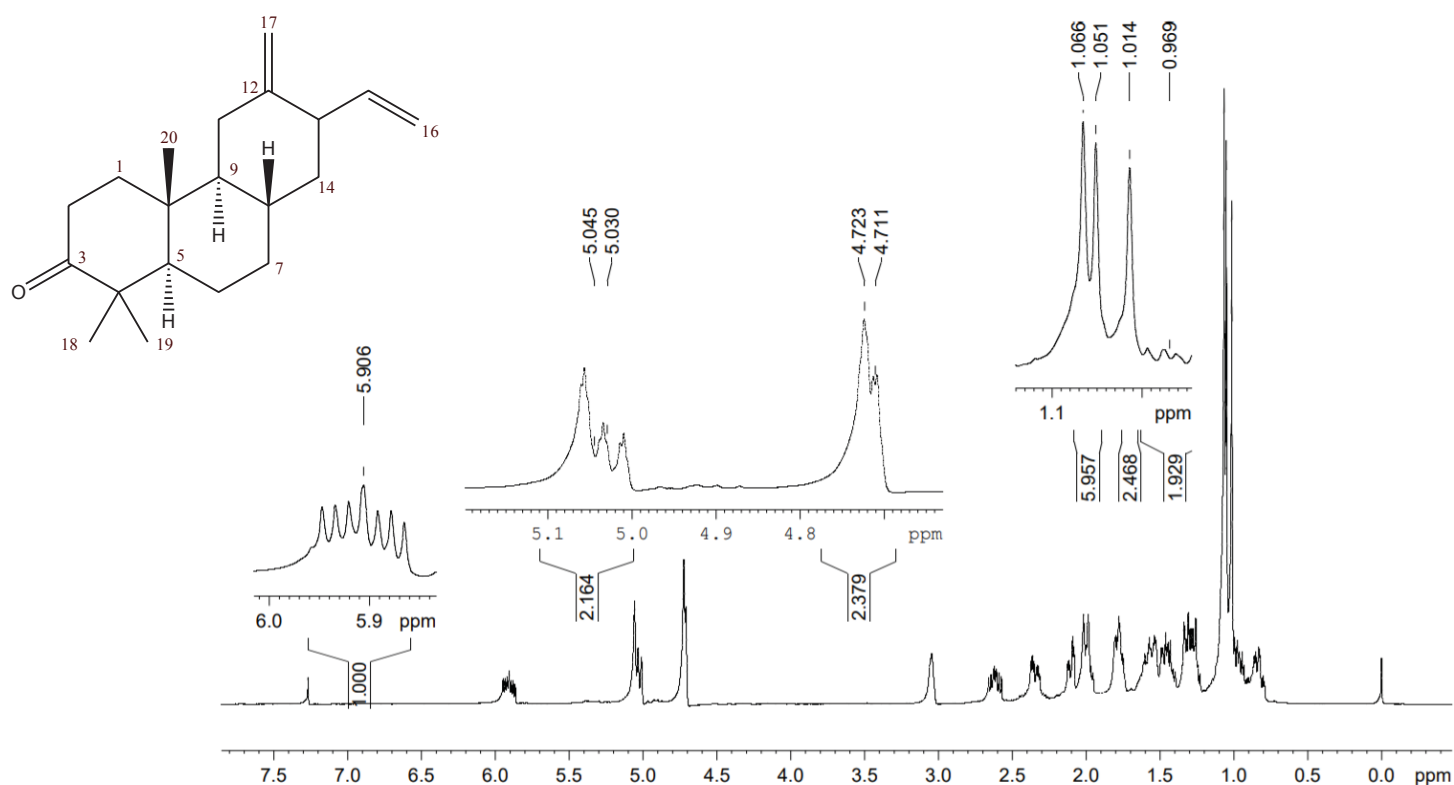
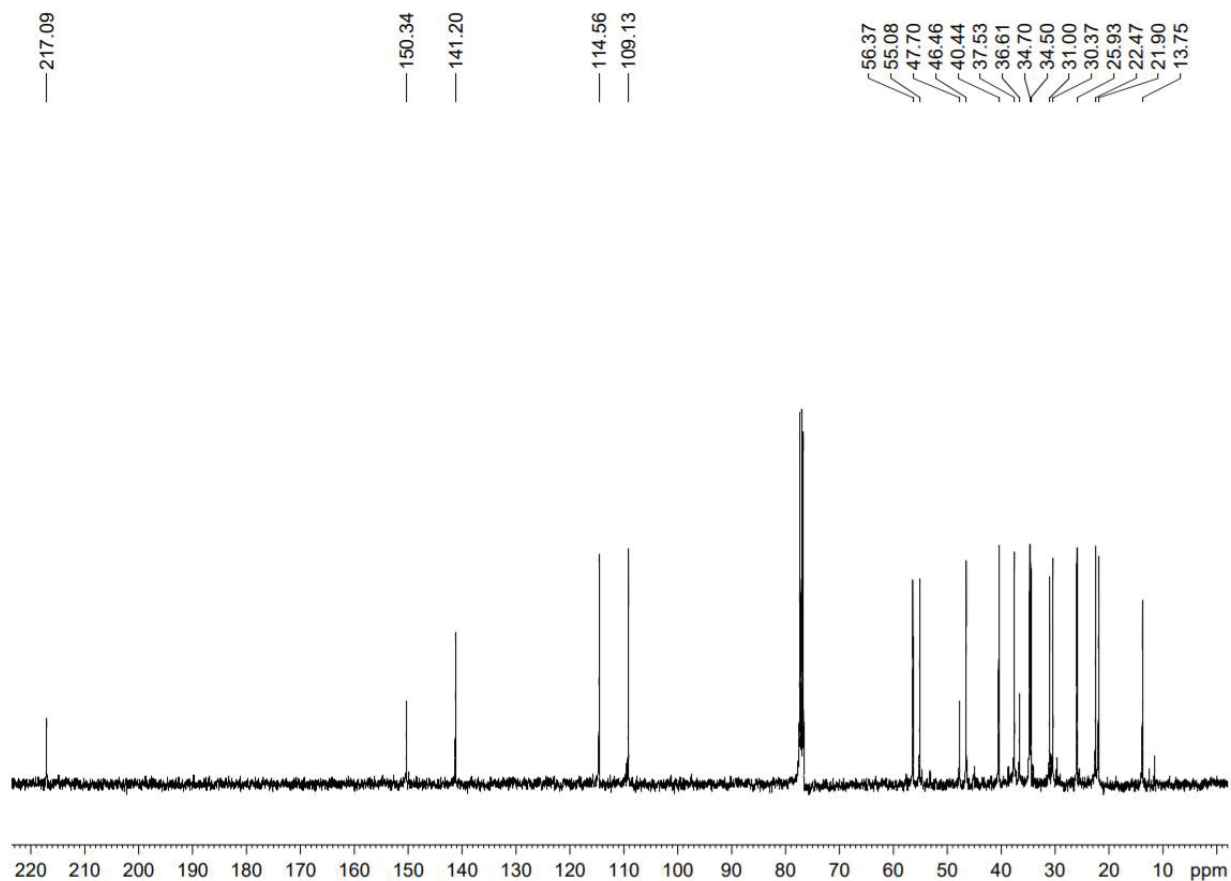


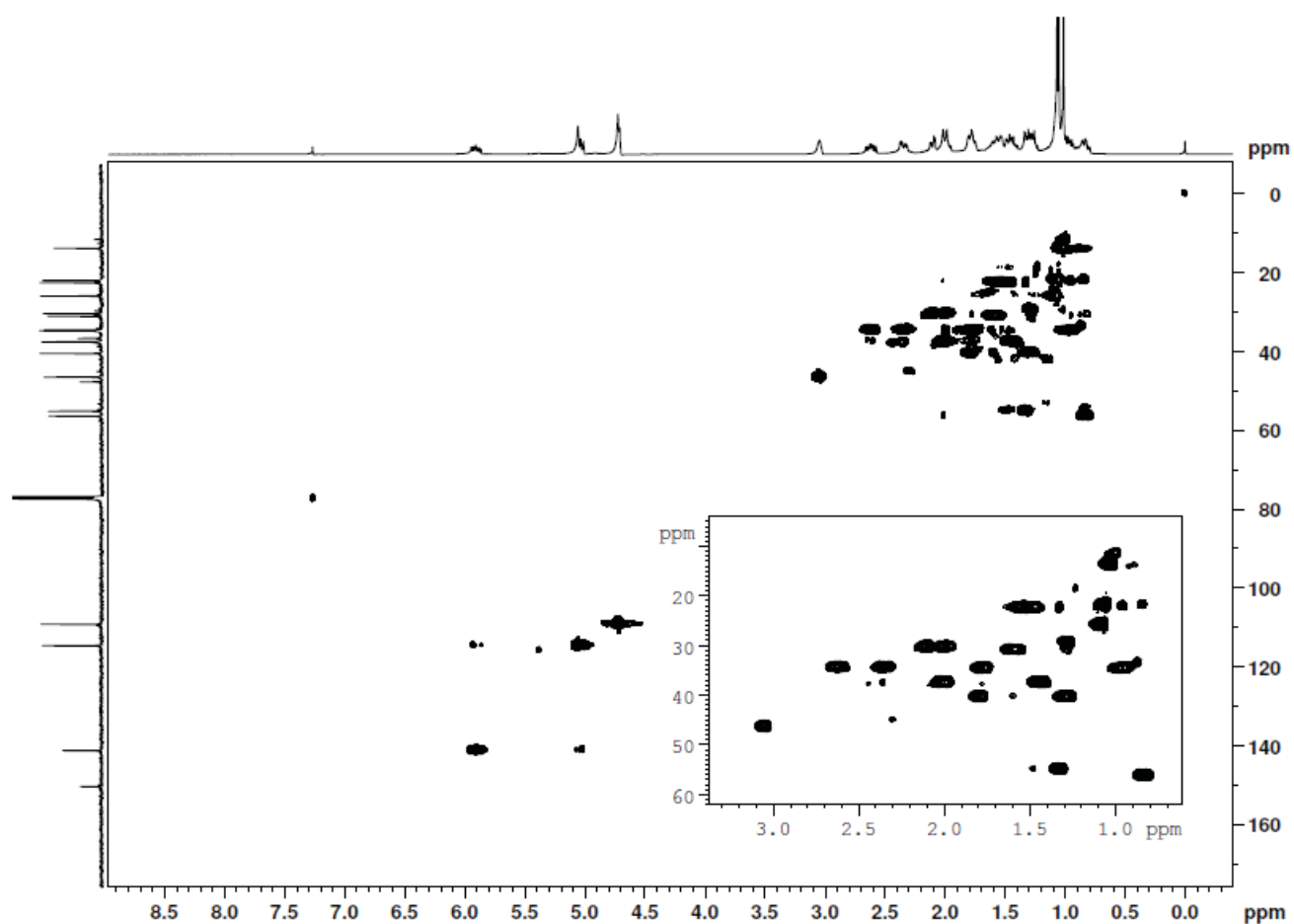
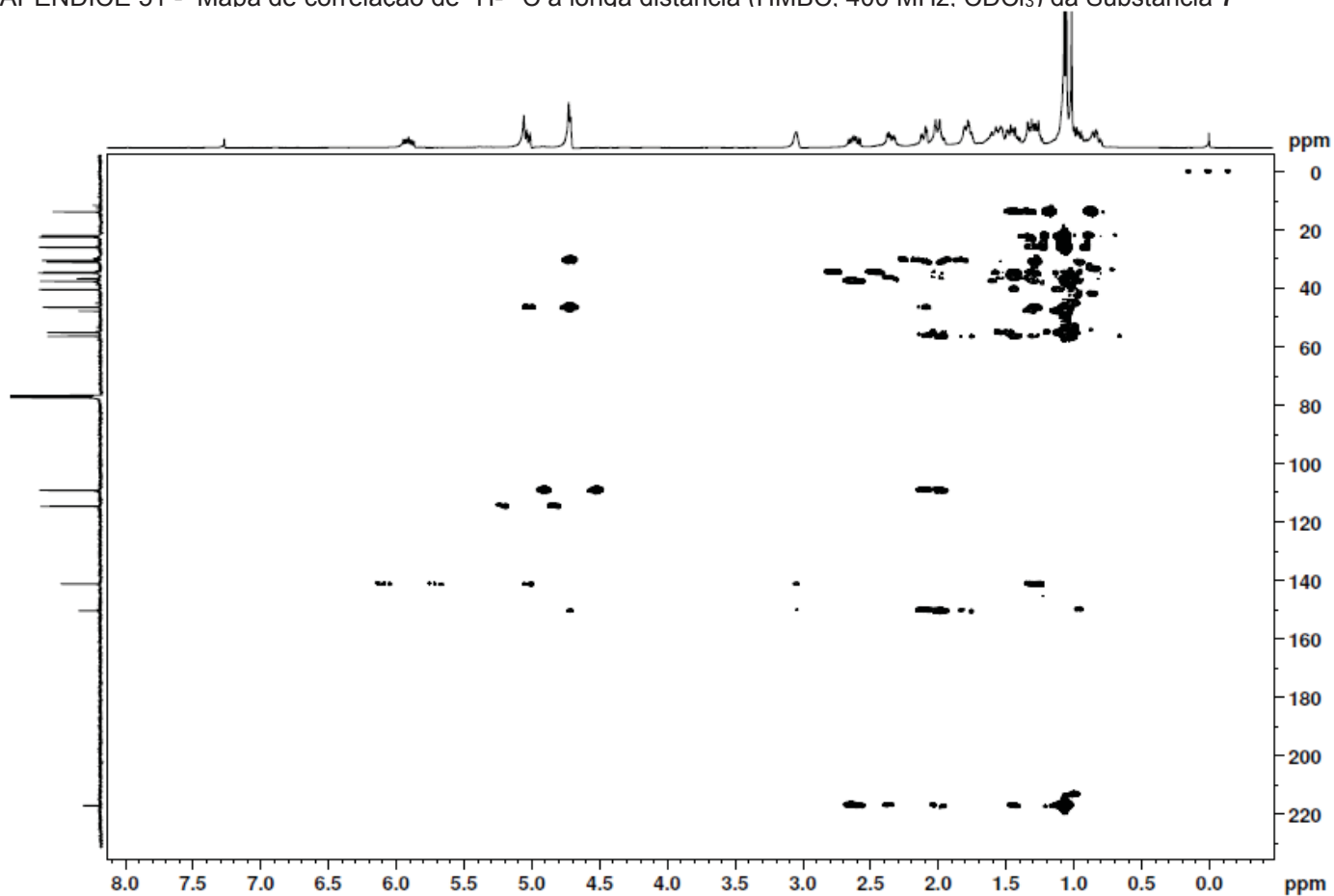
APÊNDICE 46 - Espectro de infravermelho da Substância 7

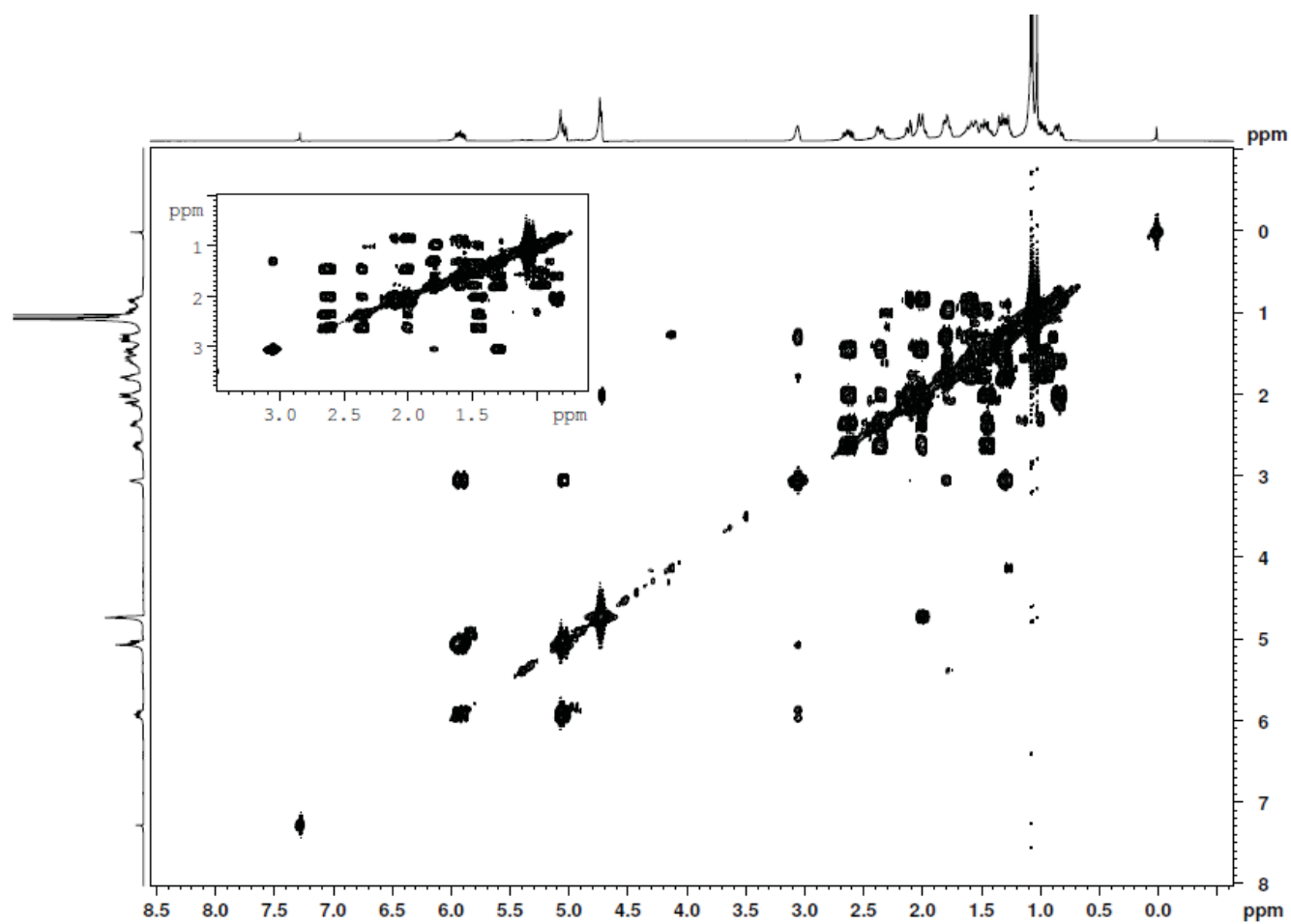
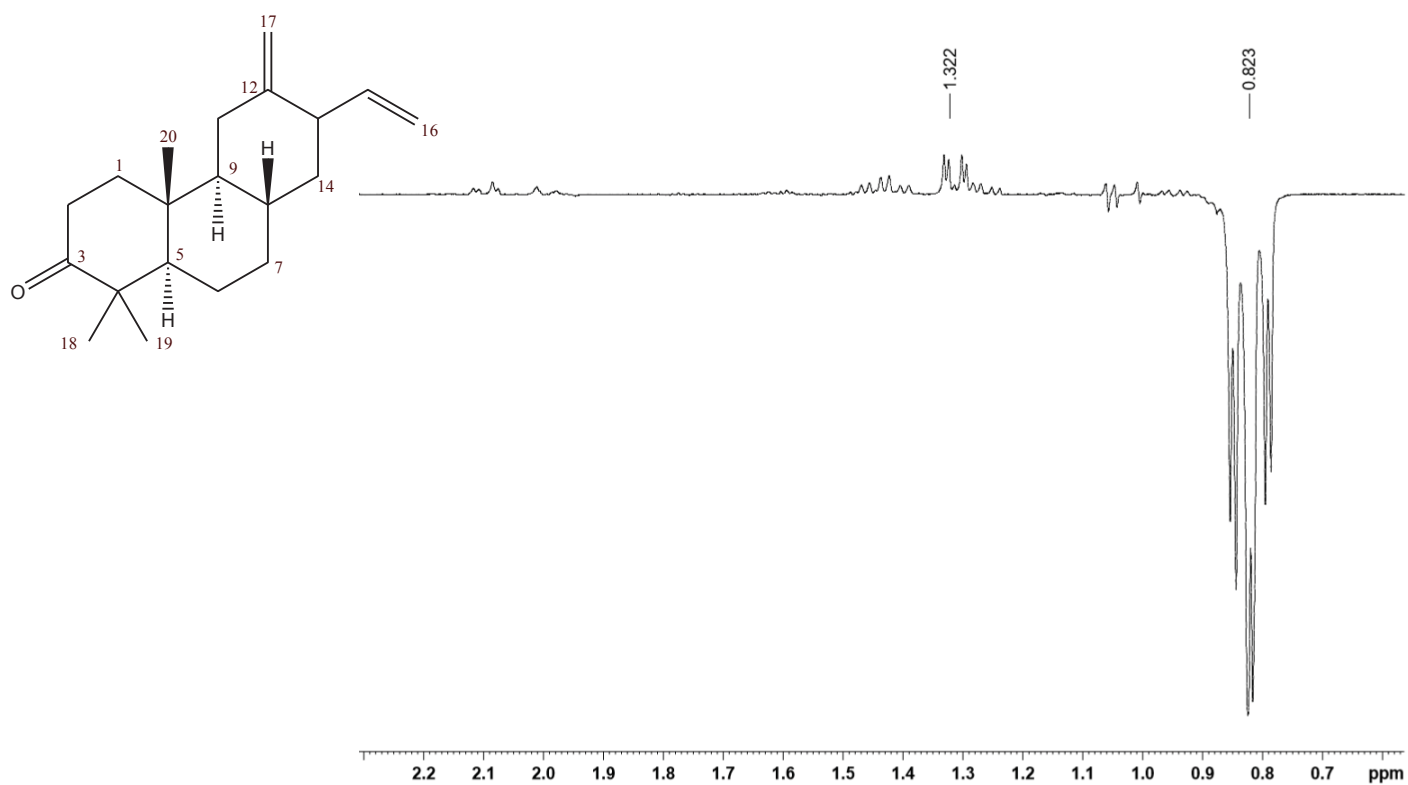


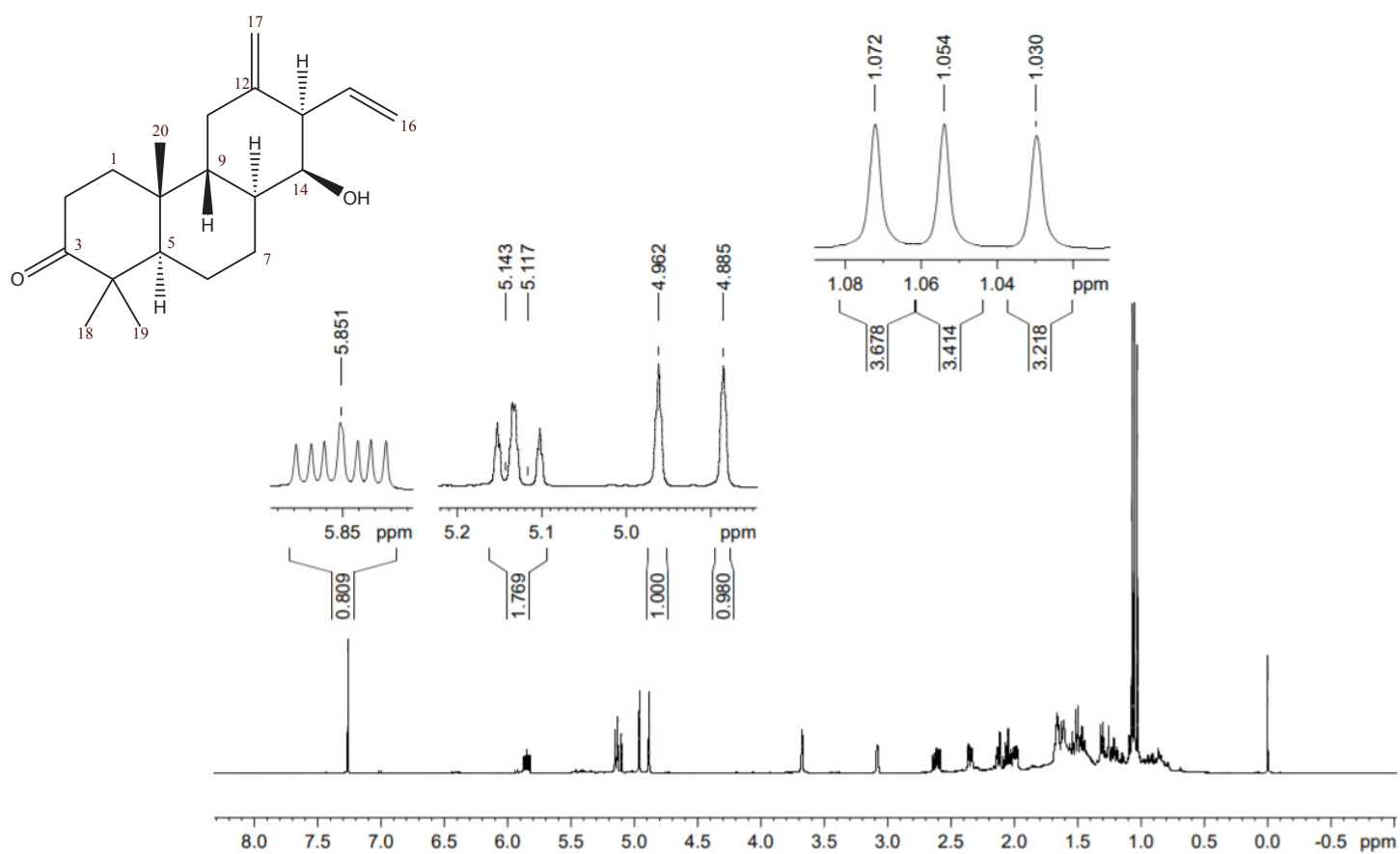
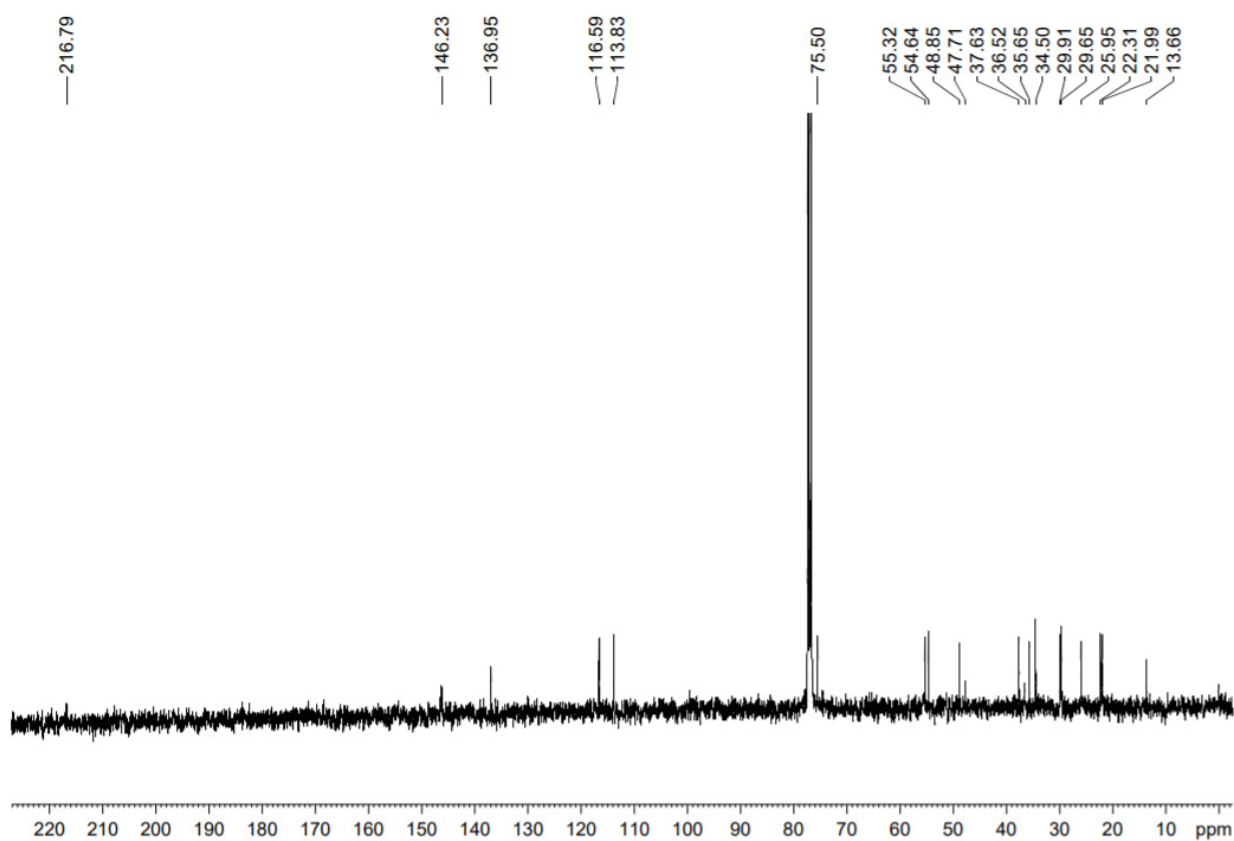
APÊNDICE 47 - Espectro UV-vis da Substância 7

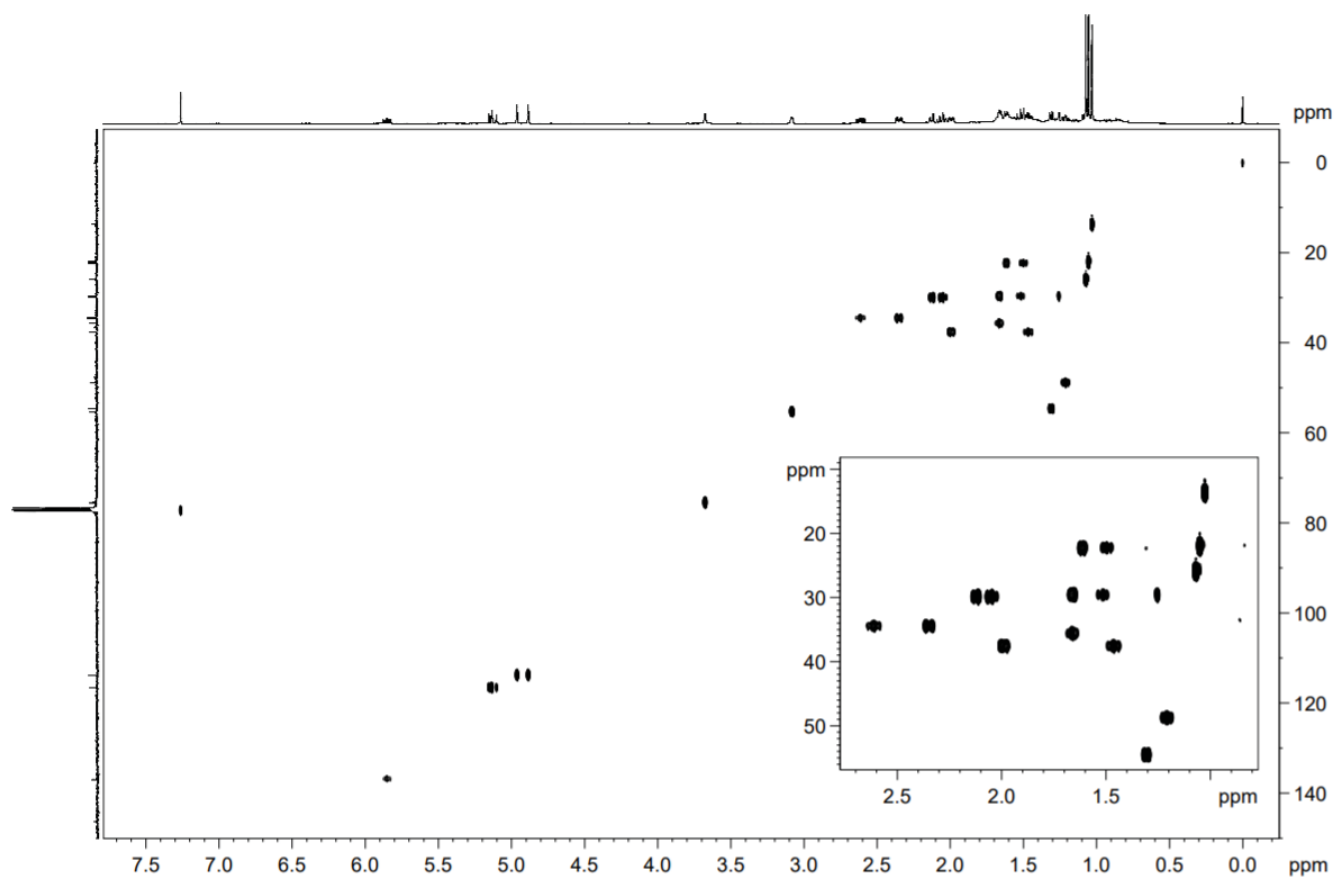
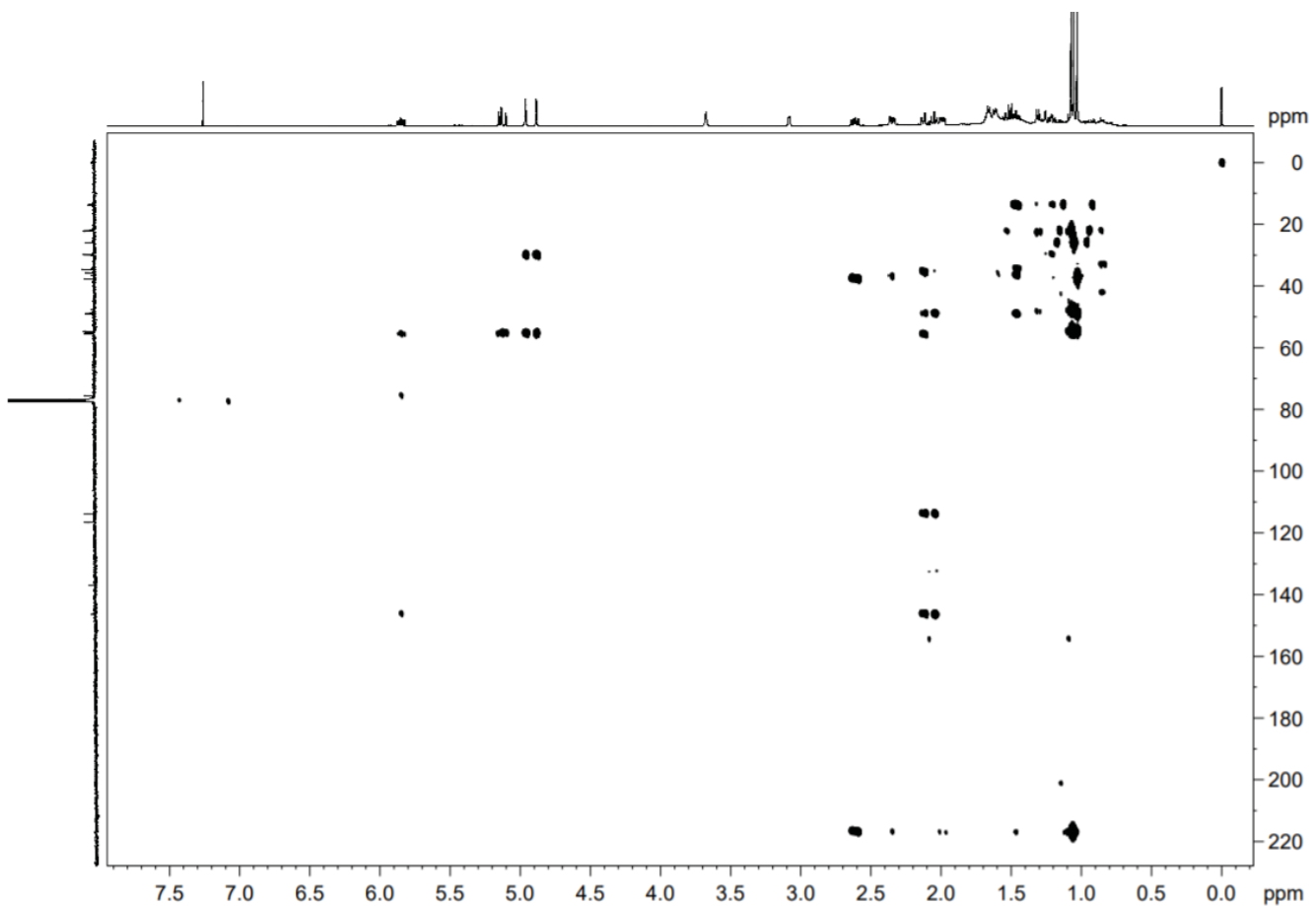


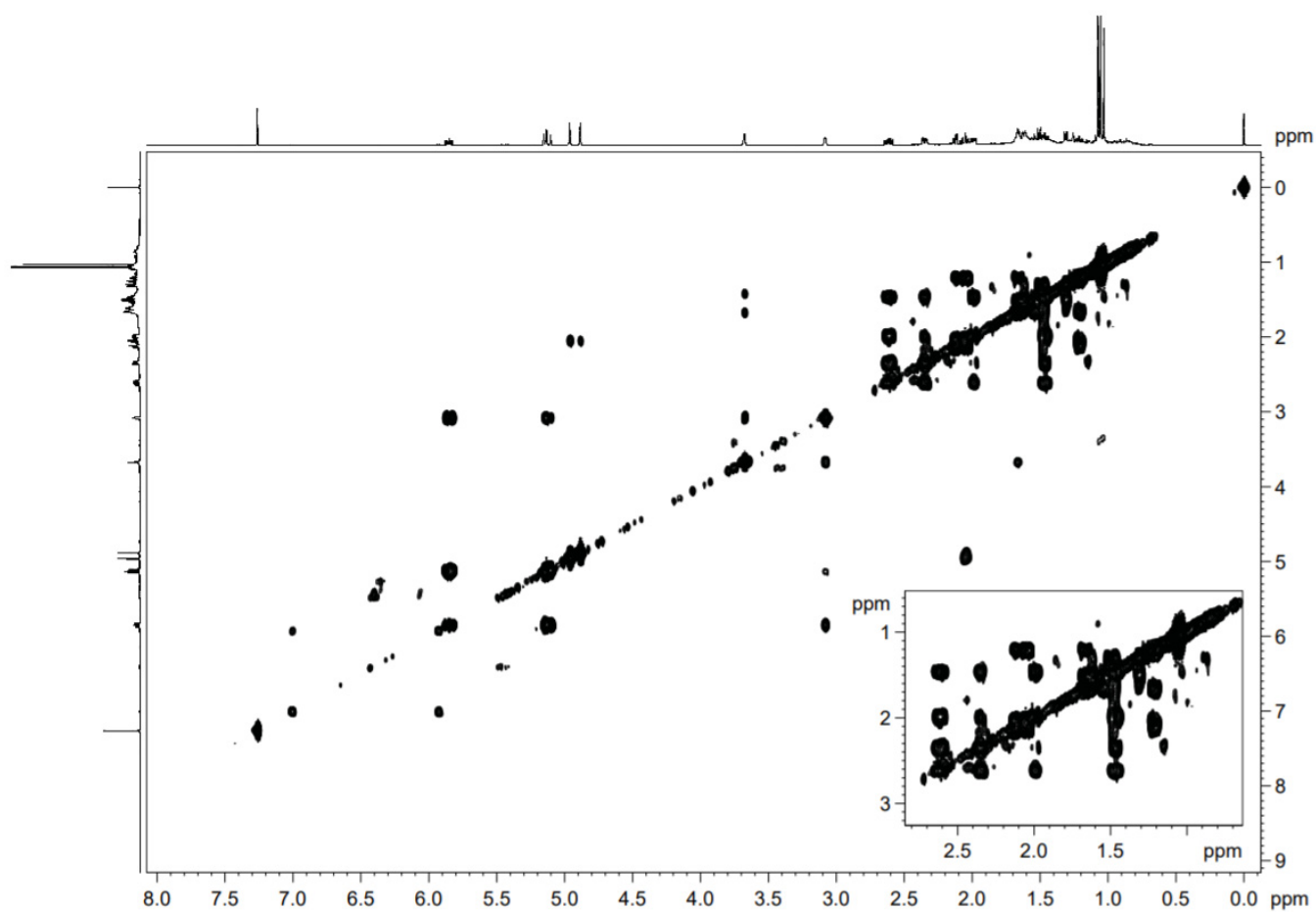
APÊNDICE 48 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância 7APÊNDICE 49 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância 7

APÊNDICE 50 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 7APÊNDICE 51 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 7

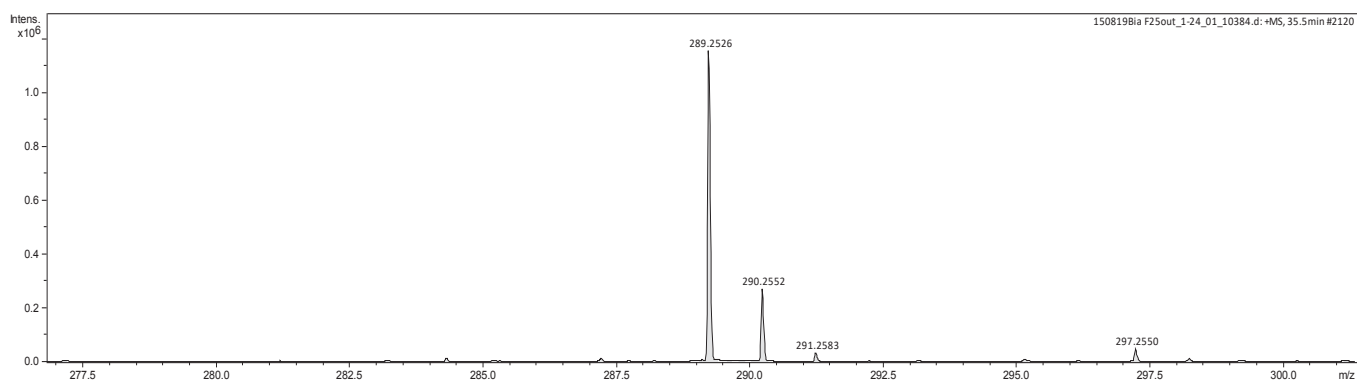
APÊNDICE 52 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 7APÊNDICE 53 - Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) da Substância 7

APÊNDICE 54 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da Substância **8**APÊNDICE 55 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância **8**

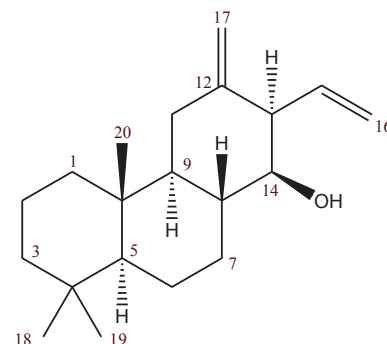
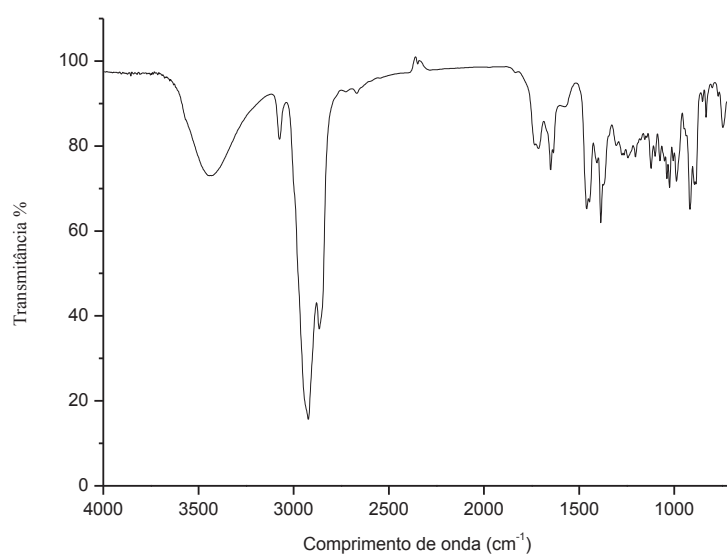
APÊNDICE 56 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **8**APÊNDICE 57 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 600 MHz, CDCl_3) da Substância **8**

APÊNDICE 58 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 600 MHz, CDCl_3) da Substância 8

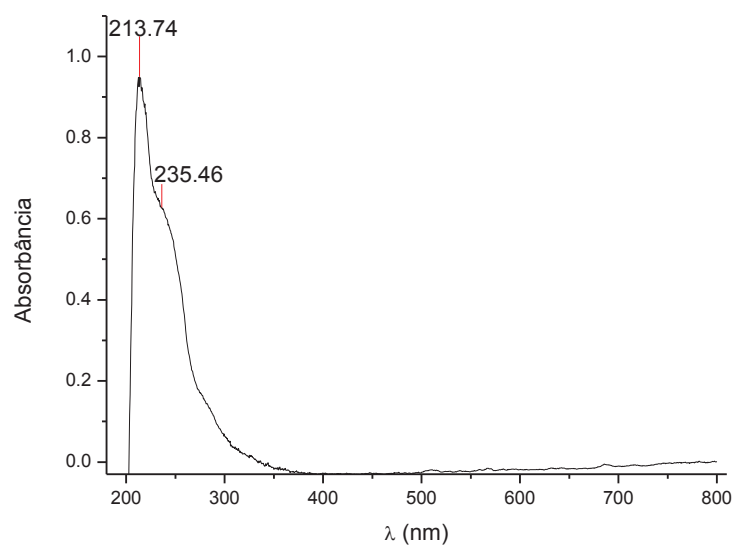
APÊNDICE 59 - Espectro de Massas da Substância 9



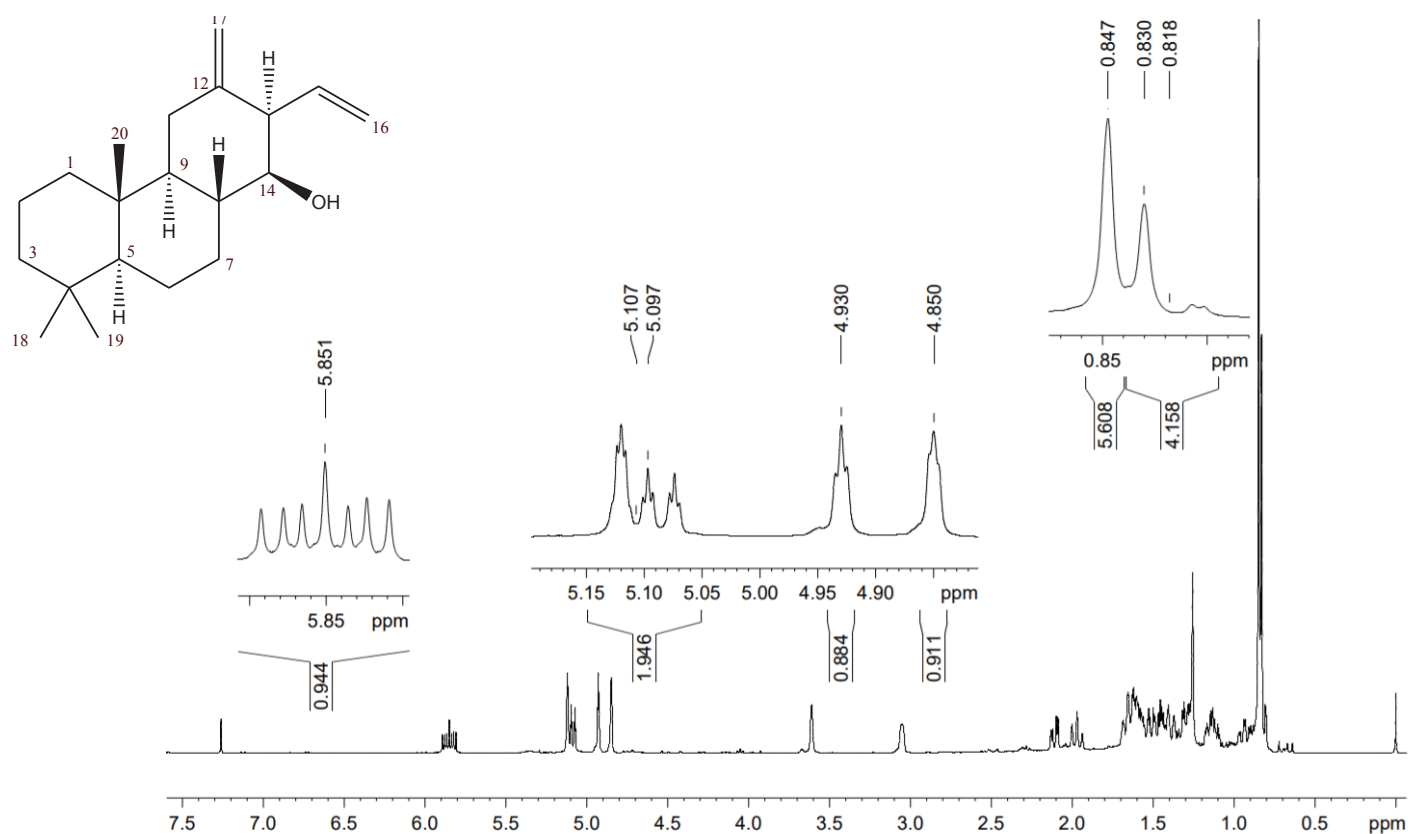
APÊNDICE 60 - Espectro de Infravermelho da Substância 9



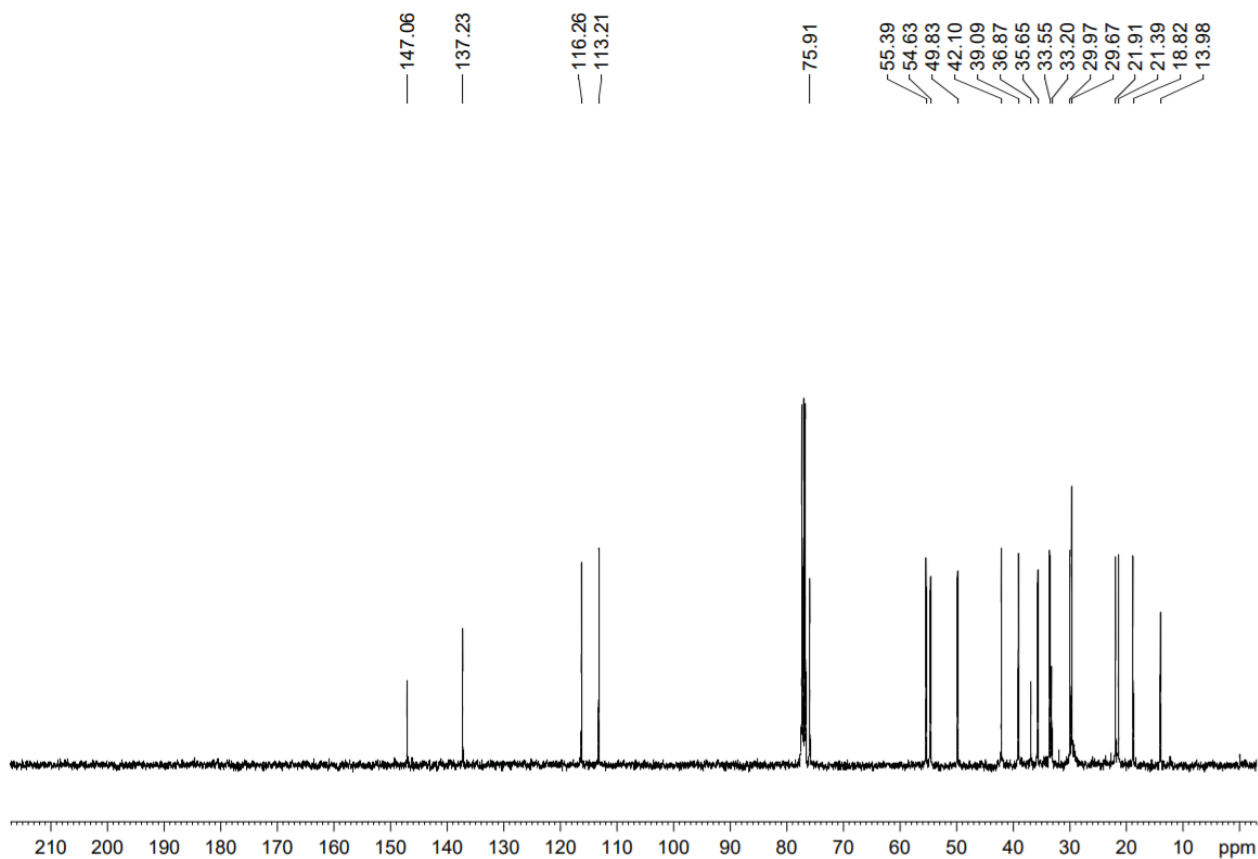
APÊNDICE 61 - Espectro UV-vis da Substância 9

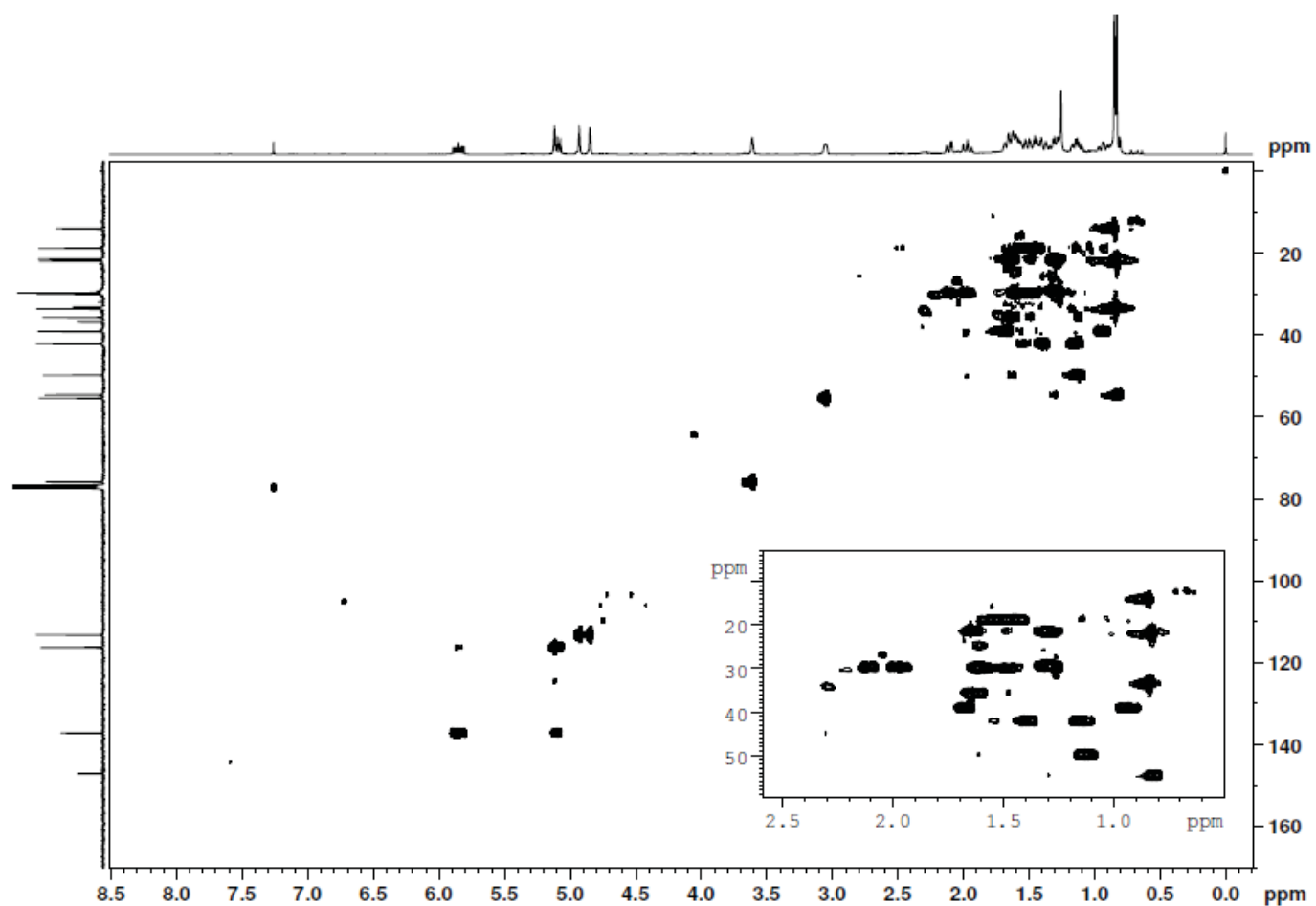
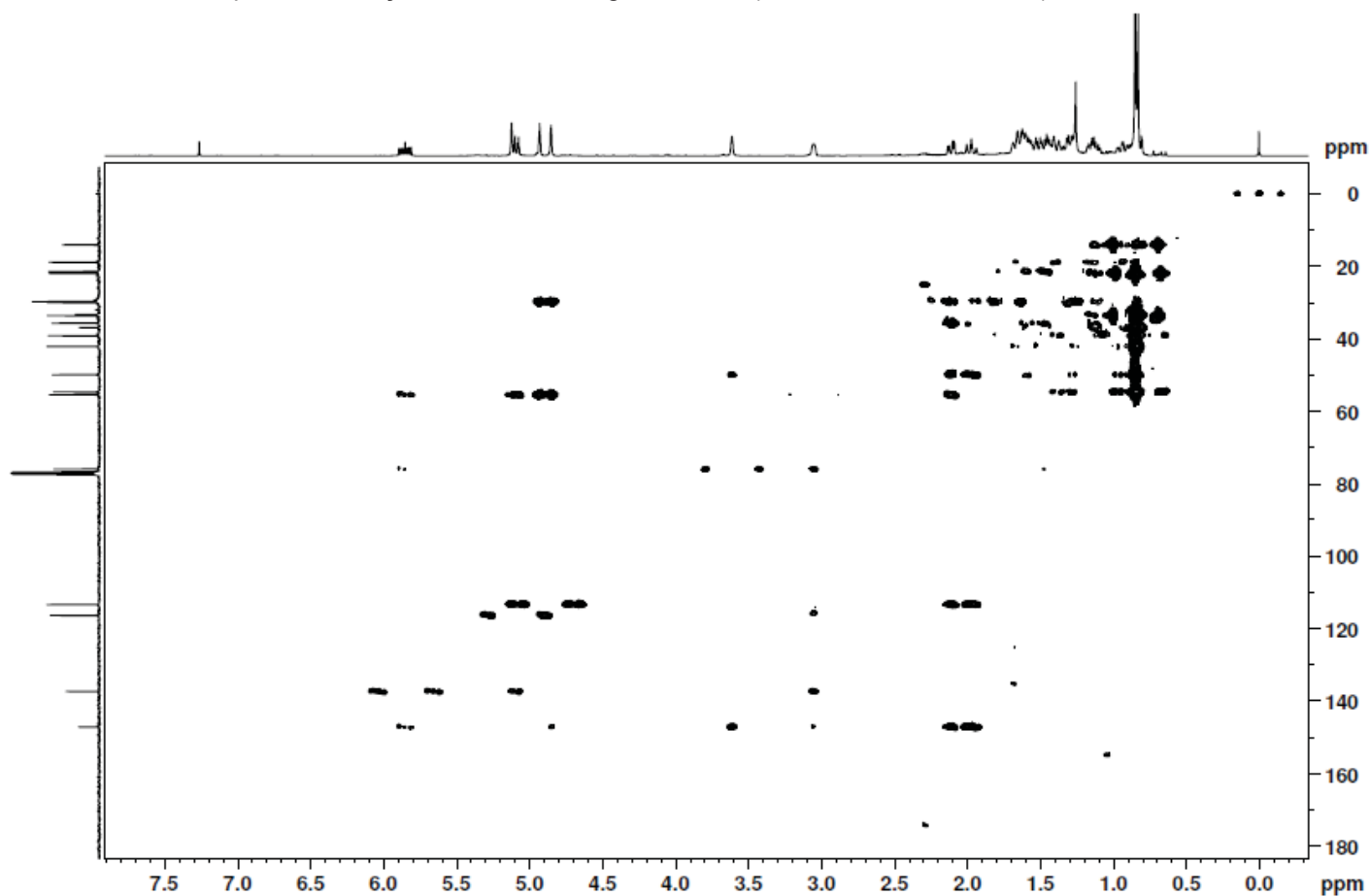


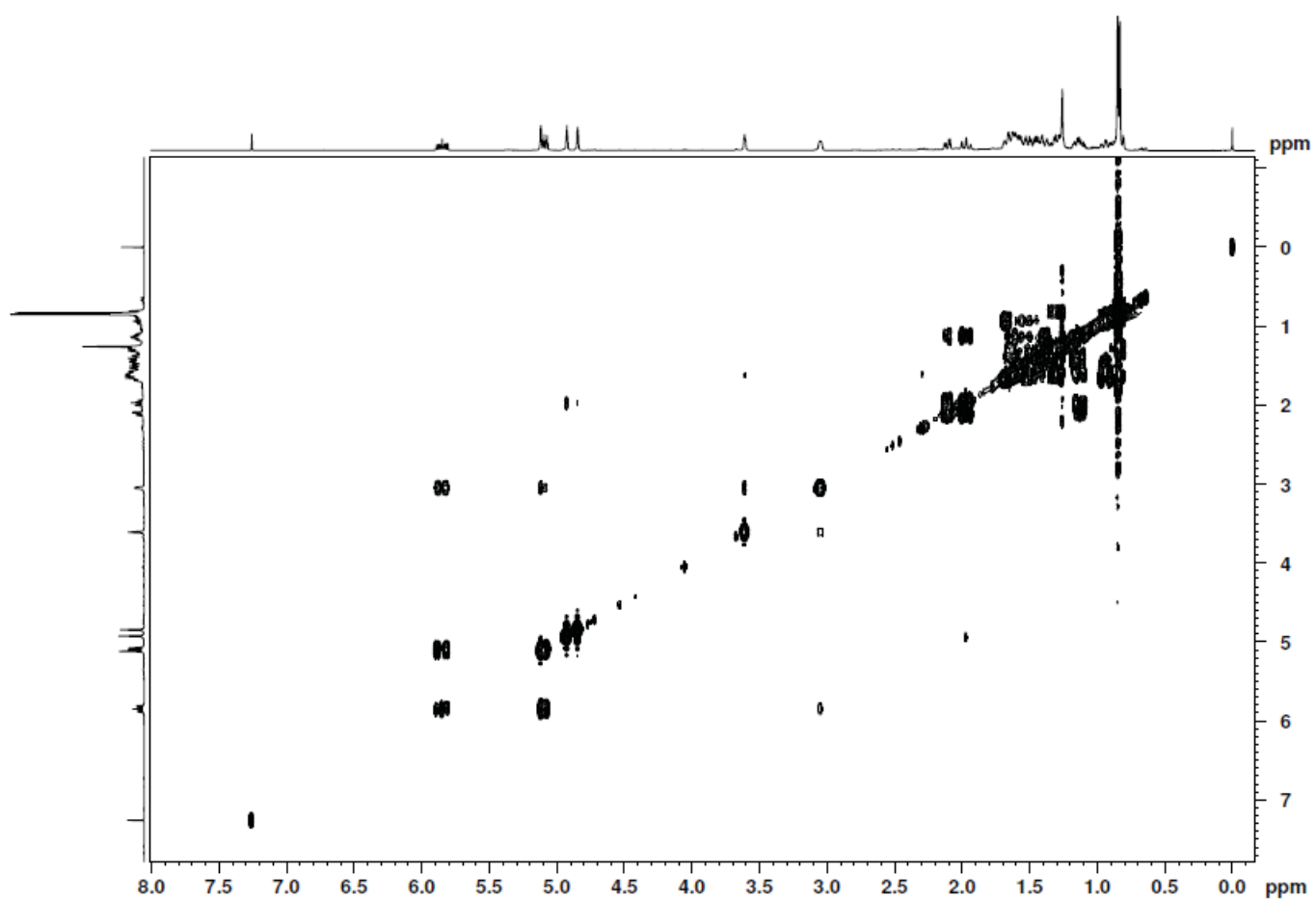
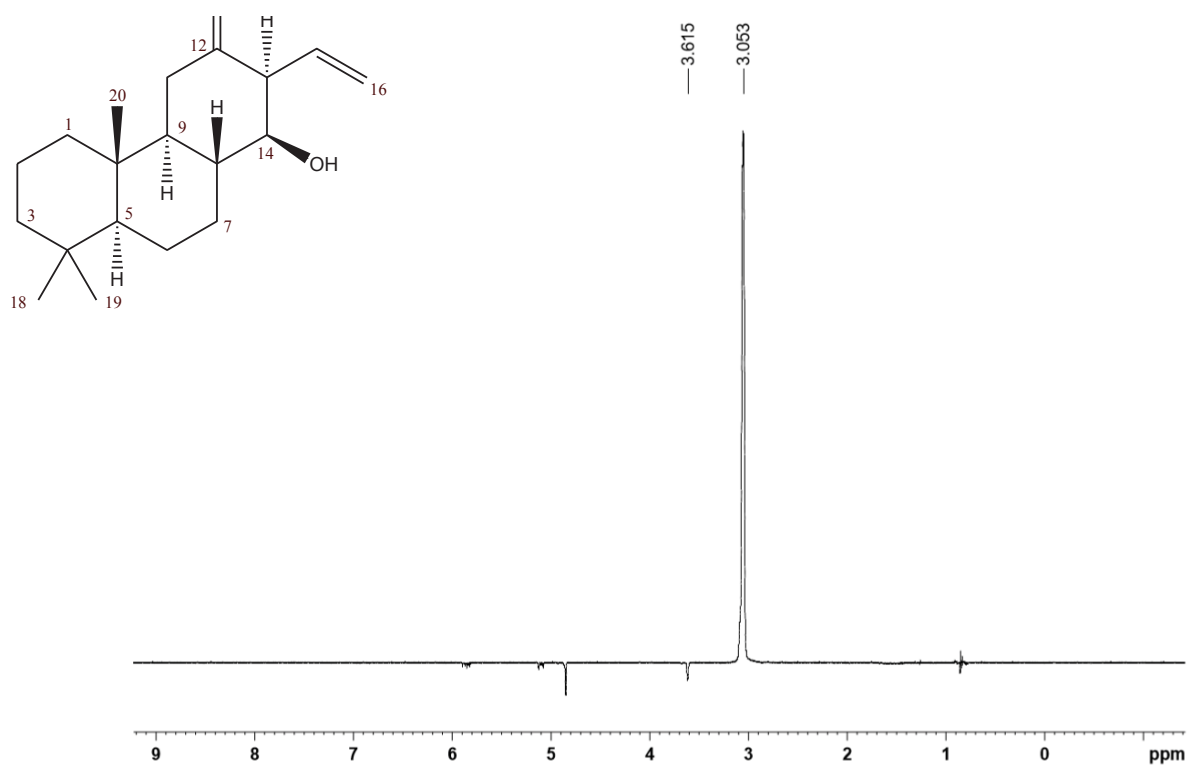
APÊNDICE 62 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância **9**

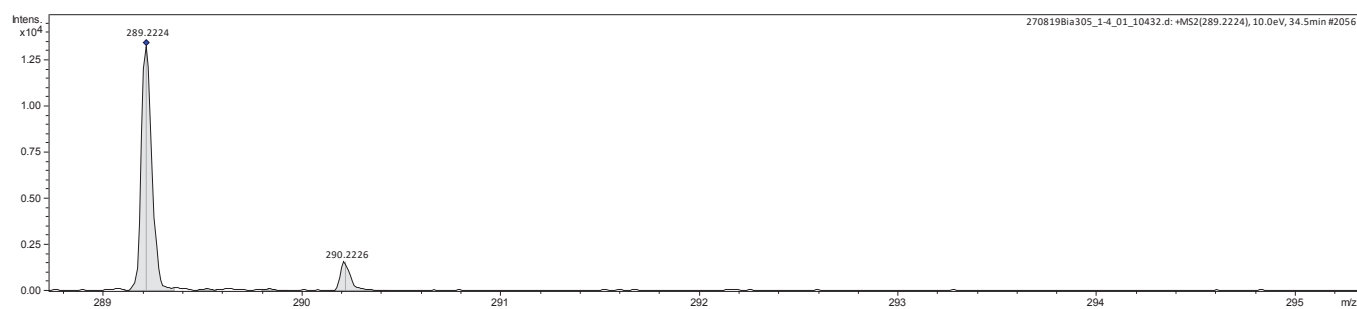
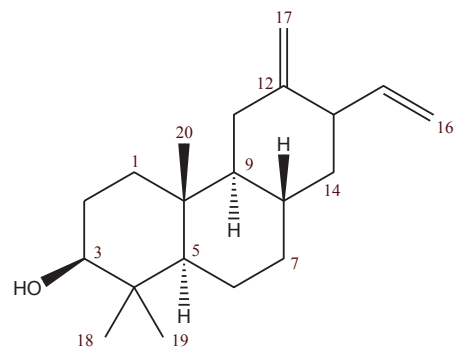
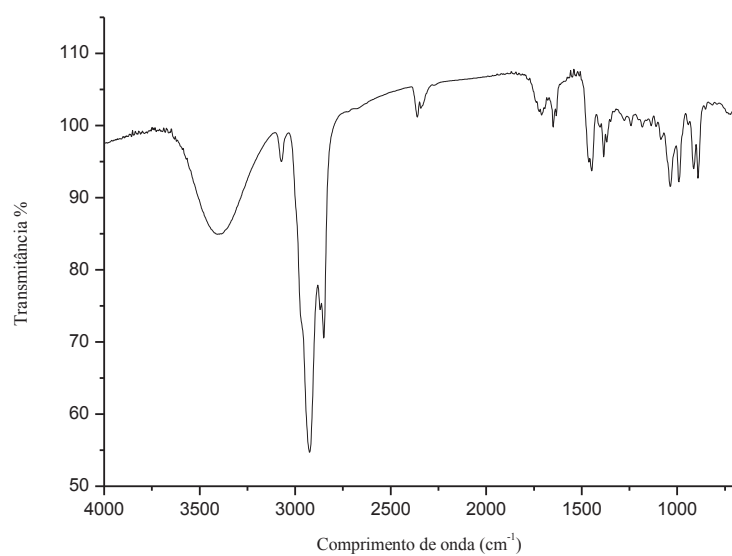
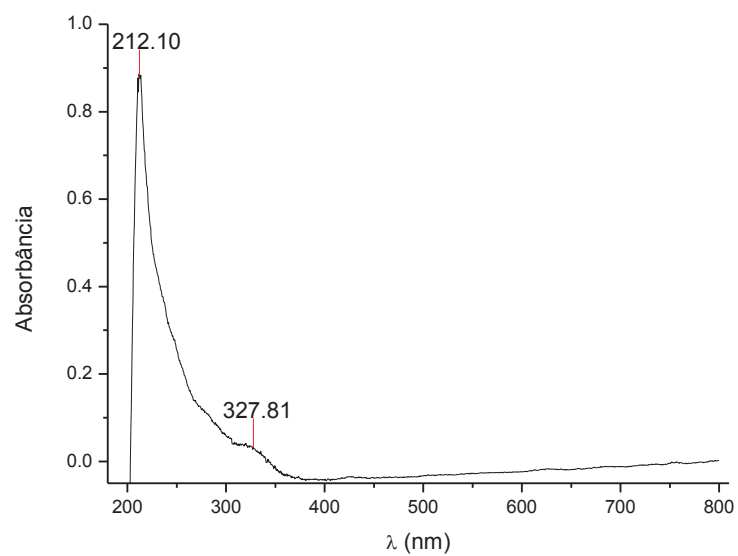


APÊNDICE 63 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância **9**

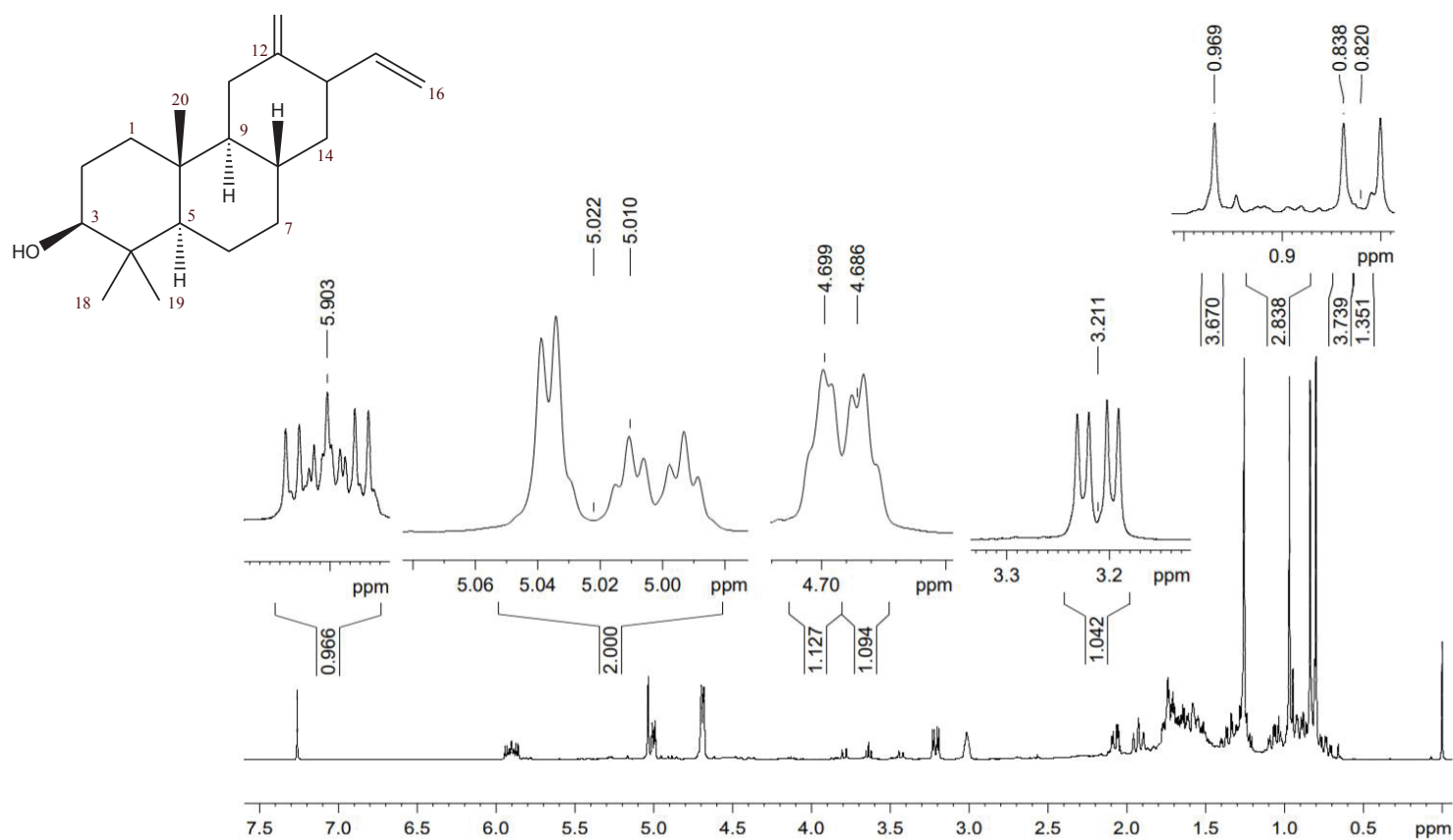


APÊNDICE 64 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 9APÊNDICE 65 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 9

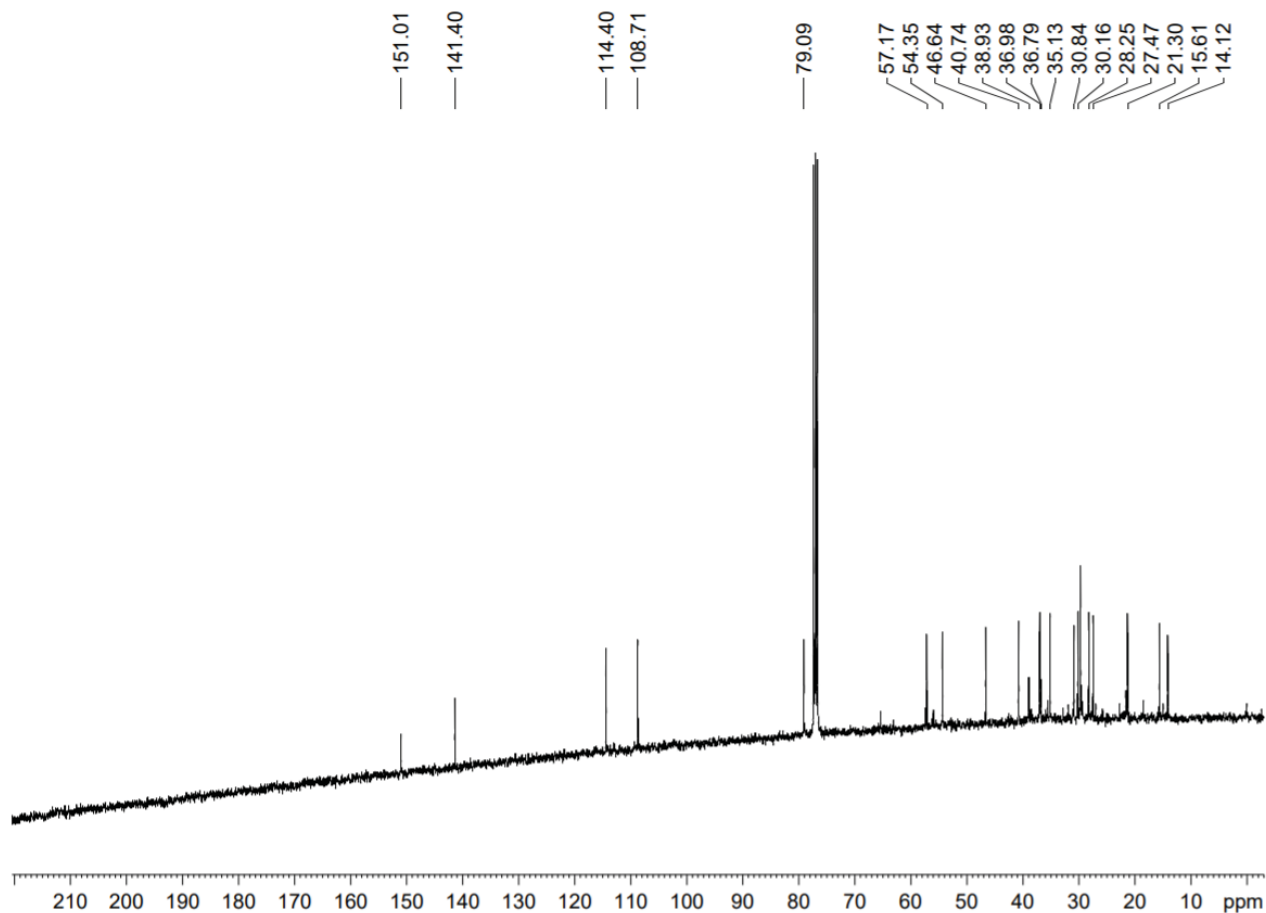
APÊNDICE 66 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 400 MHz, CDCl_3) da Substância 9APÊNDICE 67 - Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) da Substância 9

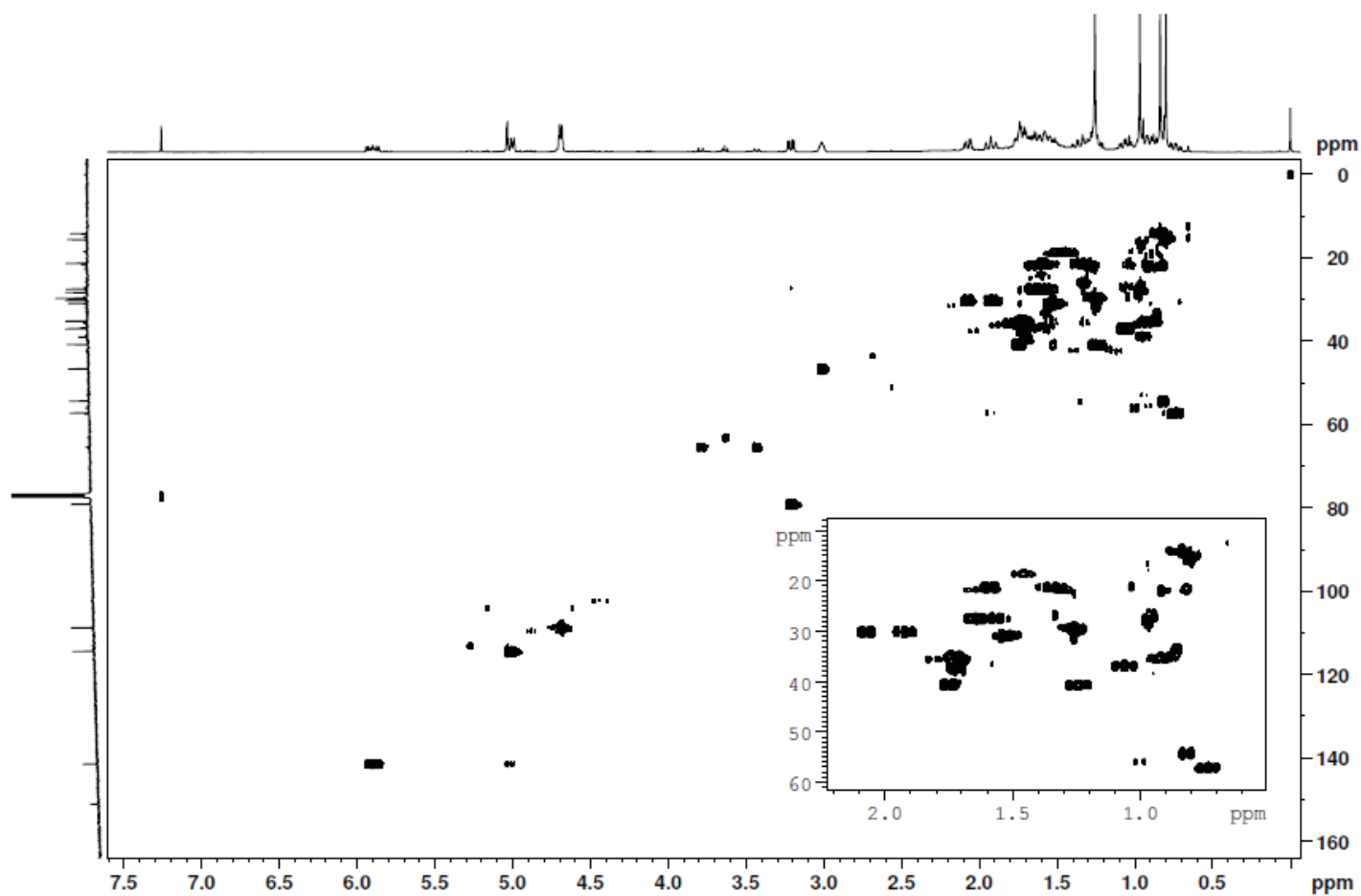
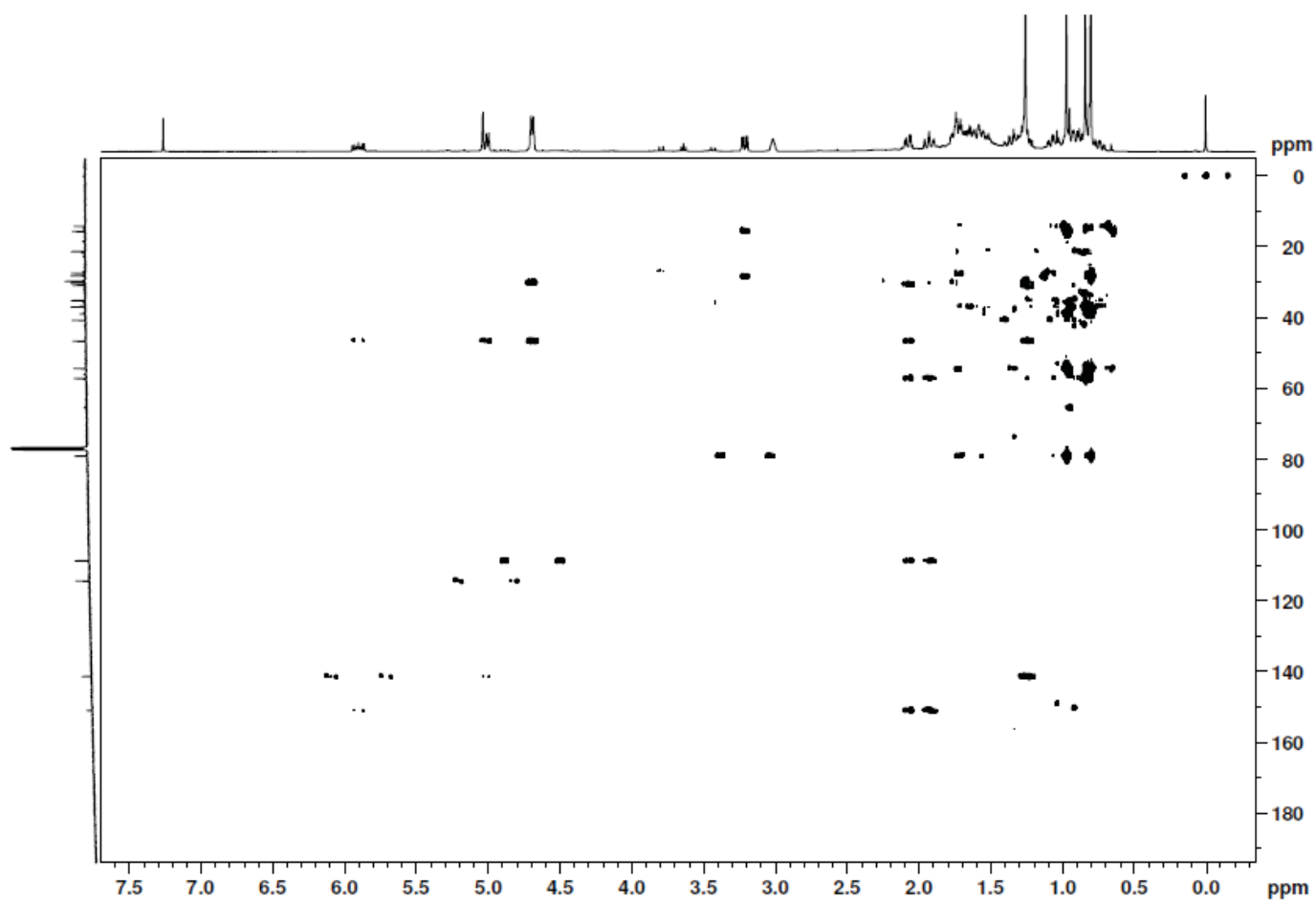
APÊNDICE 68 - Espectro de Massas da Substância **10**APÊNDICE 69 - Espectro de Infravermelho da Substância **10**APÊNDICE 70 - Espectro UV-vis da Substância **10**

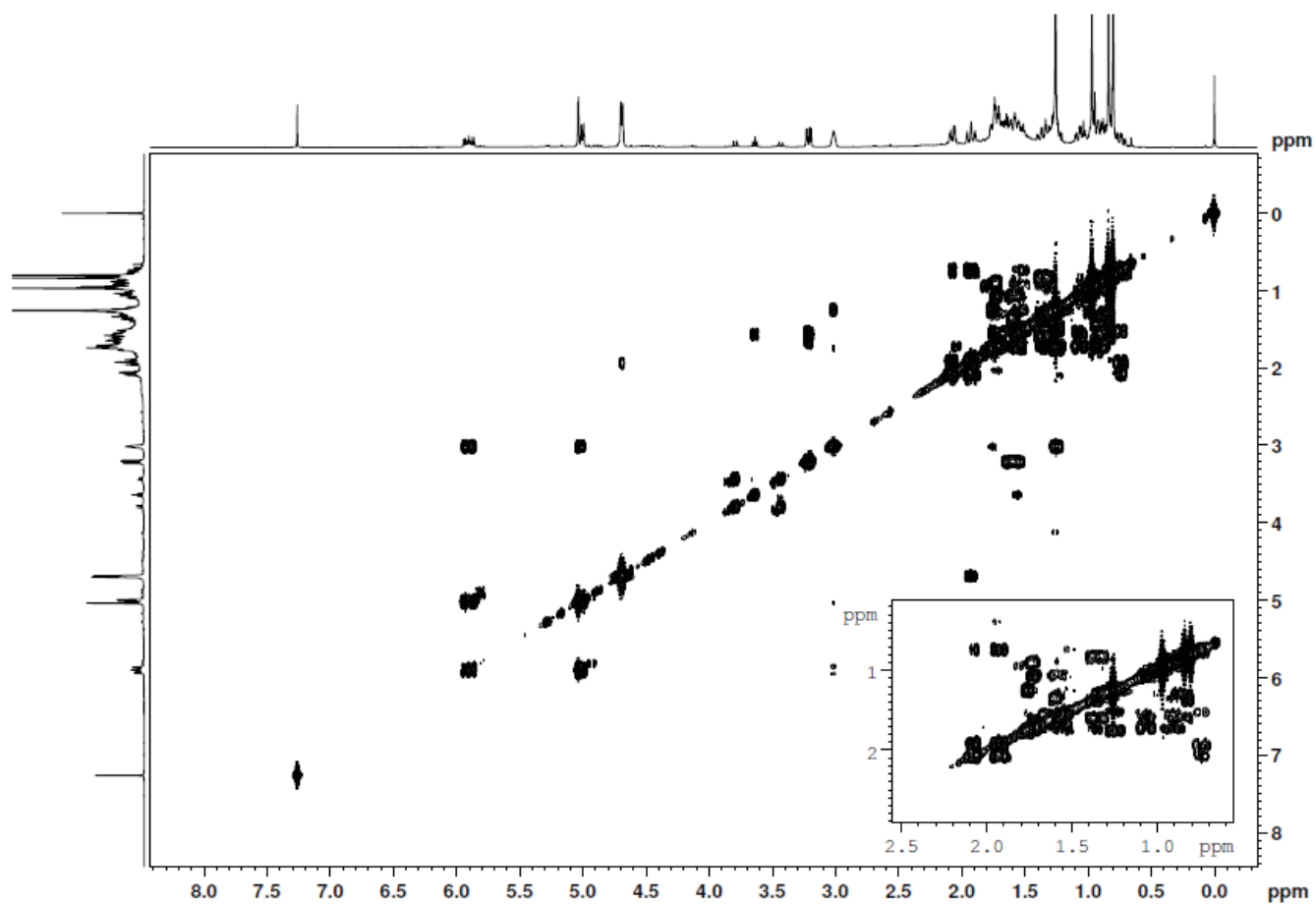
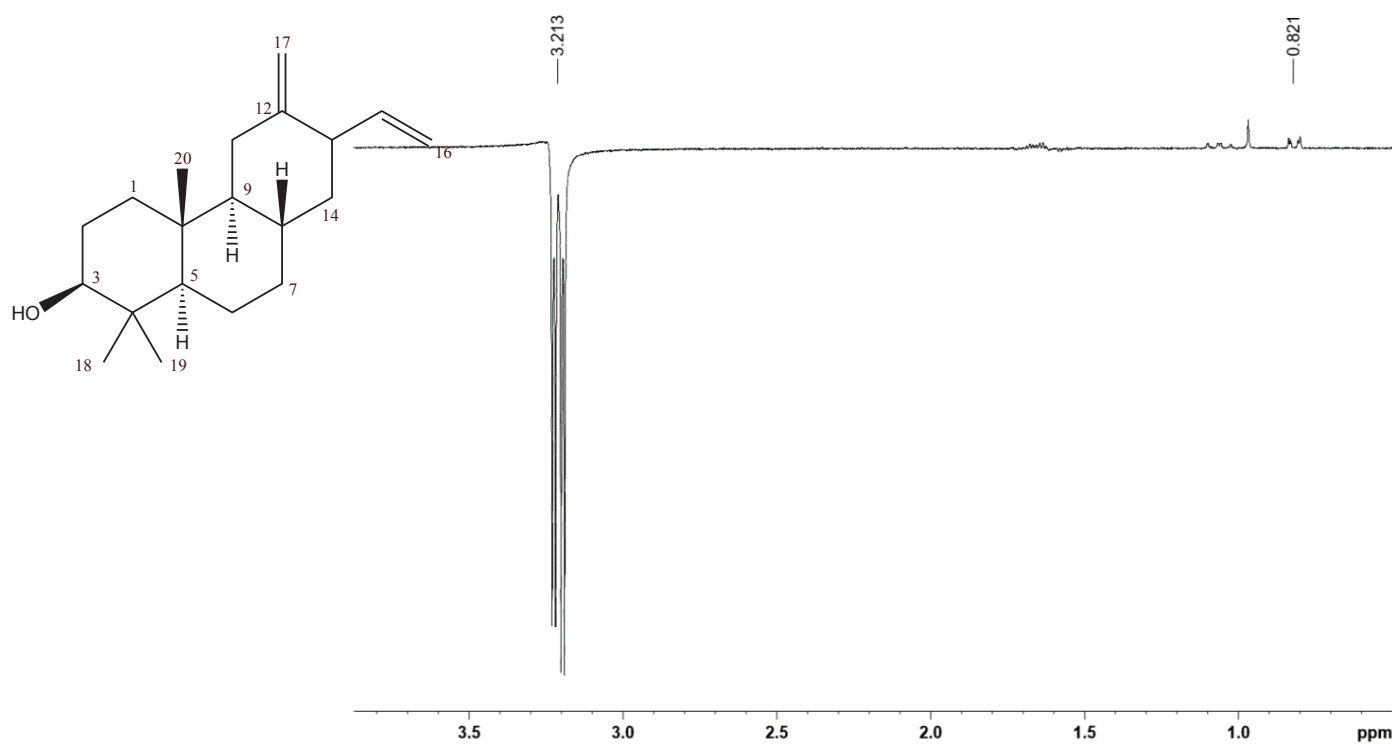
APÊNDICE 71 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância **10**

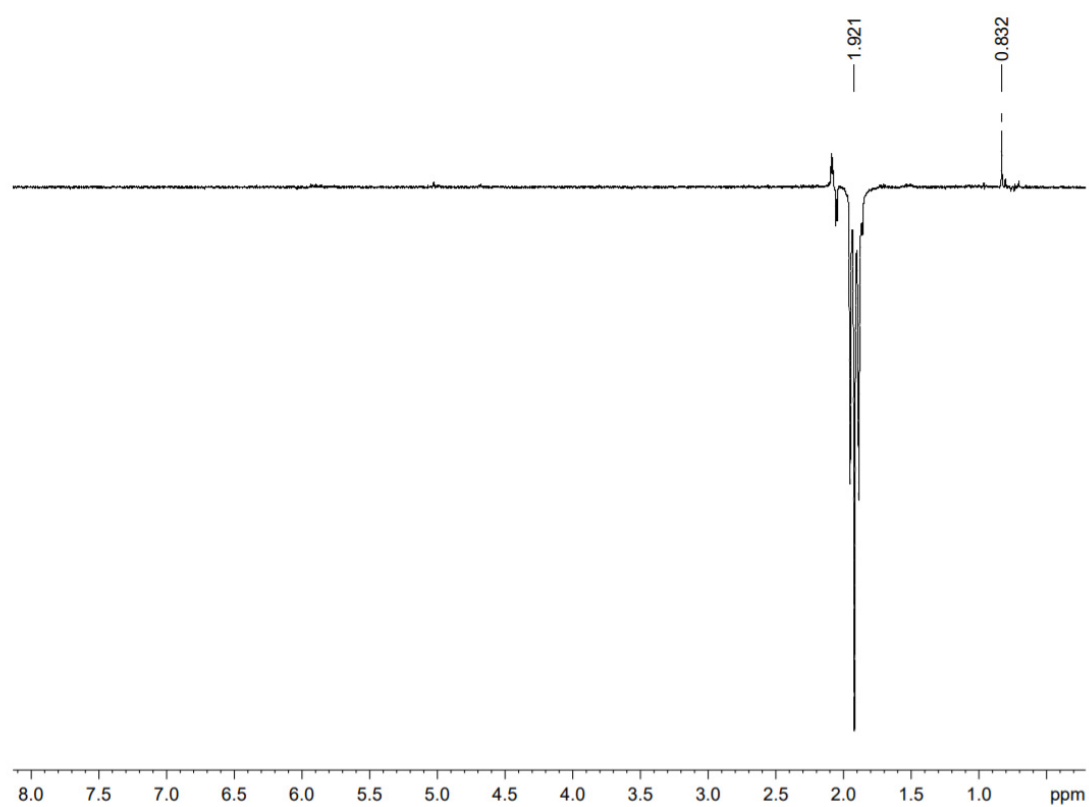


APÊNDICE 72 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da Substância **10**

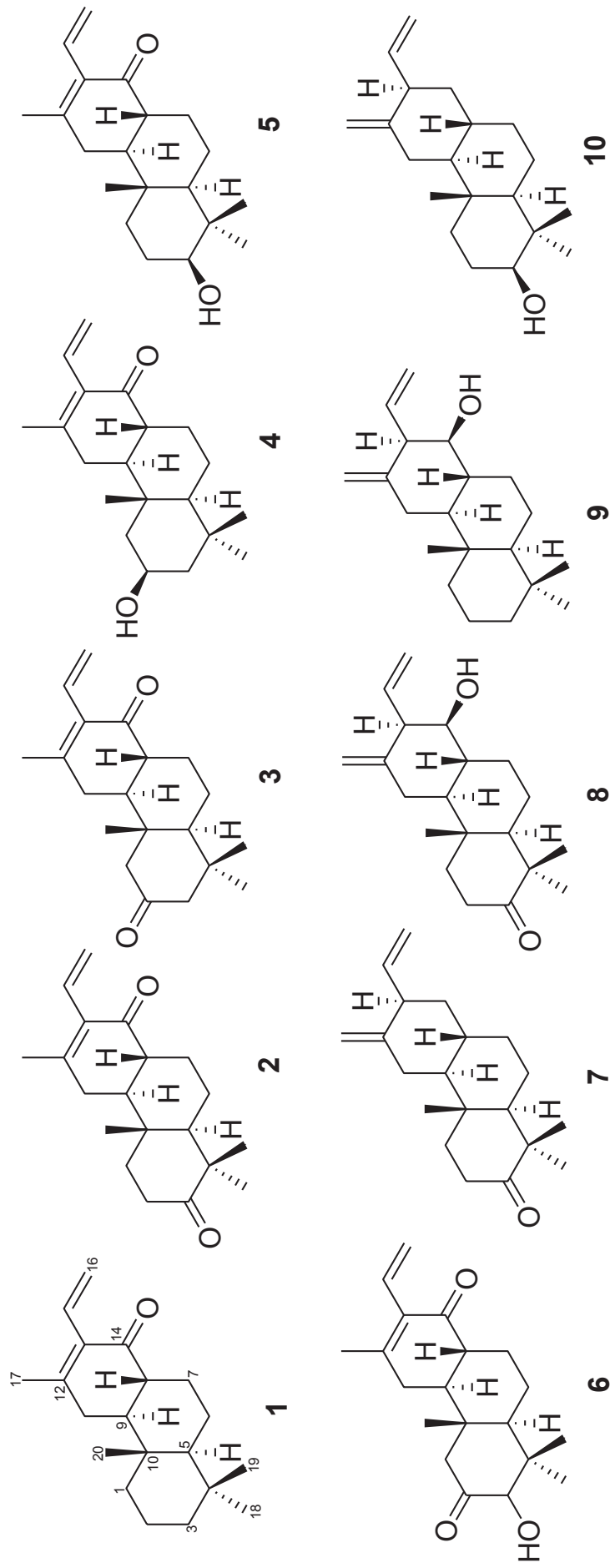


APÊNDICE 73 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) da Substância **10**APÊNDICE 74 - Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) da Substância **10**

APÊNDICE 75 - Mapa de correlação de ^1H - ^1H (COSY, 400 MHz, CDCl_3) da Substância **10**APÊNDICE 76 - Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) da Substância **10**

APÊNDICE 77 - Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) da Substância **10**

APÊNDICE 78 - Estrutura Química das Substâncias 1-10 Isoladas das Raízes de *E. plana*



APÊNDICE 79 - Dados de RMN de ¹H obtidos para as Substância 1-10 em CDCl₃

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,96, 1H, dd (13,0; 3,7)/1,69 ^a	1,48 ^a /2,02 ^a 1H, ddd (12,3; 2,3)	2,14 ^a /2,36, 1H, dd (12,3; 2,3)	1,38 ^a /1,85, 1H, ddd (13,9; 5,2; 4,0)	1,1, 1H, dt (13,3; 3,5)/1,74 ^a	2,23, 1H, d (12,2)/2,53, 1H, d (12,2)	1,44 ^a /2,00 ^a	1,46 ^a /1,99, 1H, ddd (13,2; 6,3; 3,3)	0,93, 1H, dt (13,0; 3,1)/1,65 ^a	1,07, 1H, dd (13,2; 4,1)/1,72 ^a
2	1,47 ^a /1,57 ^a	2,37 ^a /2,65, 1H, ddd (15,4; 13,2; 6,4)	4,19, 1H, q (4,2)	1,60 ^a /1,68, 1H, q (3,8)	2,34, 1H, ddd (15,3; 5,4; 3,4)/2,61, 1H, ddd (15,3; 12,9; 6,4)	2,34, 1H, ddd (15,4; 5,4; 3,4)/2,61, 1H, ddd (15,4; 13,1; 6,4)	1,44 ^a /1,54 ^a	2,34, 1H, ddd (15,4; 5,4; 3,4)/2,61, 1H, ddd (15,4; 13,1; 6,4)	1,56 ^a /1,64 ^a	
3	1,15, 1H, dt (13,4; 3,9)/1,41 br dd (13,2;1,6)		2,17 ^a /2,33, 1H, br d (13,2)	1,45 ^a /1,68, ddd (14,3, 4,8, 1,6)	3,23, 1H, dd (11,7; 4,3)	3,93, 1H, br s	1,14 ^a /1,38 ^a		3,21, 1H, dd (11,6; 4,5)	
5	0,83 ^a , dd (12,0; 2,5)	1,32, 1H, dd (12,0; 2,6)	1,44, br dd (12,2; 2,0)	0,92 ^a , dd (11; 2,4)	0,83 ^a , dd (12,6; 2,2)	1,52, 1H, dd (12,1; 2,1)	1,32 ^a	1,30, 1H, dd (12,0; 2,4)	0,81 ^a dd (<10; 2,1) sobreposto	0,82 ^a
6	1,30, 1H, dt, (13,1; 3,6)/1,69 ^a	1,49 ^a /1,68 ^a	1,40, 1H, dt (12,4; 3,6)/1,84, br m	1,40 ^a /1,72 ^a	1,36, dq (13,1; 3,8)/1,72 ^a	1,45, 1H, dq (12,9; 3,8)/1,86, 1H, br m	1,32 ^a /1,53 ^a	1,48 ^a /1,61 ^a	1,30 dt (12,8; 3,9)/1,61 ^a	1,36 dt (12,9; 3,7)/1,59 ^a
7	1,22, 1H, ddd (13,2; 4,0; 1,8)/2,30, 1H, m	1,25, 1H, br ddd (13,4; 4,4; 1,8)/2,39 ^a	1,30 ^a /2,41 br m	1,22, 1H, ddd (13,3; 4,5; 1,7)/2,33 ^a	1,21, 1H, ddd (13,3; 4,5; 1,9)/2,34, 1H, br m	1,31 ^a /2,42, 1H, br qd (13,9; 3,9)	0,96 ^a , dt (12,4; 5,0)/1,77 ^a	1,52 ^a /1,65 ^a	1,49 br dt (11,2; 3,0)/1,59 ^a	0,90 ^a /1,72 ^a
8	2,16 ^a , dt (12,0; 4,5)	2,21, 1H, ddd (13,2;	2,17 ^a	2,19, 1H, ddd (13,1;	2,15, 1H, ddd (13,3;	2,16 ^a	1,58 ^a	1,66 ^a	1,63 ^a	1,52 ^a

11,6; 4,5)										
11,8; 4,6)										
11,6; 4,6)										
9	1,48 ^a	1,54 ^a	1,75, ddd (13,1; 11,8; 4,6)	1,47 ^a	1,45, 1H, ddd (13,2; 9,7, 6,5)	1,79, 1H, ddd (12,9; 4,5; 1,9)	0,82, 1H, dt (12,0; 3,8)	1,21, 1H, dt (11,9; 4,2)	1,12 ^a	0,73, 1H, ddd (12,4; 11,4; 3,9)
11	2,24, 1H, d (11,1)/2,26, 1H, d (5,2)	2,31, 2H, br d (7,9)	2,17 ^a /2,28, 1H, br d (11,9)	2,29 ^a	2,25, 1H, d (10,3)/2,26, 1H, d (6,2)	2,19 ^a /2,29, 1H, d (11,6)	2,00 ^a /2,10, 1H, dd (12,9; 3,8)	2,04, br t (13,0)/2,12, 1H, dd (13,1; 4,2)	1,97, 1H, br t (12,7)/2,11, 1H, dd (13,1; 4,2)	1,92, br t (12,7)/2,07 dd (12,9; 3,9)
13	3,04 br s									
14	1,28 ^a /1,77 ^a									
15	6,40, 1H, dd (17,8; 11,5)	6,40, 1H, dd (17,8; 11,7)	6,40, 1H, dd (17,8; 11,6)	6,40, 1H, dd (17,8; 11,6)	6,40, 1H, dd (17,8; 11,6)	6,39, 1H, dd (17,8; 11,6)	5,90, 1H, ddd (16,6; 10,7; 5,3)	5,85, 1H, ddd (16,3; 10,4; 5,6)	5,85, 1H, ddd (16,7; 10,7; 5,86)	5,90 ddd (16,5; 11,3; 5,4)
16	5,44, 1H, dd (17,8; 2,1)/5,37, 1H, dd (11,6; 2,1)	5,46, 1H, dd (17,9; 2,1)/5,39, 1H, dd (11,6; 2,1)	5,40, 1H, dd (11,6; 2,1)/5,45, 1H, dd (17,8; 2,1)	5,38, 1H, dd (11,6; 2,0)/5,45, 1H, dd (17,8; 2,0)	5,38, 1H, dd (11,6; 2,1)/5,44, 1H, dd (17,8; 2,1)	5,41, 1H, dd (11,6; 2,0)/5,45, 1H, dd (17,8; 2,0)	5,04, 1H, br dt (9,0; 1,6)/5,02, 1H, br dt (17,7; 1,6)	5,11, 1H, br d(17,6; 1,6)/5,14, 1H, br d (10,7; 1,6)	5,09, 1H, br dt (18,4; 1,6)/5,10, 1H, br dt (9,2; 1,6)	5,01 ^a , 1H, dd (17,3; 1,8)/5,02 ^a , 1H, dd (10,2; 1,8)
17	2,01, 3H, s	2,04, 3H, s	2,03, 3H, s	2,03, 3H, s	2,01, 3H, s	0,91, s	4,72, 1H, br d (1,9)/4,71, 1H, br s	4,88, br s/4,96, br s	4,84, 1H, br s/4,92, 1H, br t (2,0)	4,68, 1H, br s/4,69, 1H, br s
18	0,86, 3H, s	1,09, 3H, s	1,07, 3H, s	0,91 ^a , s	0,99, 3H, s	1,19, 3H, s	1,06, 3H, s	1,07, 3H, s	0,84 ^a s	0,96, 3H, s
19	0,85, 3H, s	1,07, 3H, s	0,90, 3H, s	1,08, 3H, s	0,82 ^a , s	0,72, 3H, s	1,05, 3H, s	1,05, 3H, s	0,83, 3H, s	0,80, 3H, s
20	0,92, 3H, s	1,11, 3H, s	0,94, 3H, s	1,18, 3H, s	0,92, 3H, s	0,91, 3H, s	1,01, 3H, s	1,02, 3H, s	0,84 ^a s	0,83, 3H, s

APÊNDICE 80 - Dados de RMN de ^{13}C obtidos para as Substância **1-10** em CDCl_3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	38,78	37,21	53,54	44,79	36,83	50,93	37,52	37,62	39,08	36,98
2	18,75	34,35	210,73	67,74	27,32	210,19	34,49	34,50	18,81	27,47
3	41,97	216,24	56,34	46,97	78,85	82,69	217,08	216,79	42,09	79,08
4	33,14	47,66	39,24	32,61	38,83	45,52	47,70	47,70	33,19	38,90
5	54,30	54,33	53,79	52,90	53,56	52,84	55,08	54,63	54,62	54,35
6	20,93	21,76	21,22	20,94	20,64	20,74	22,47	22,31	21,38	21,29
7	27,44	27,12	27,15	27,31	27,44	27,11	34,69	29,64	29,97	35,13
8	44,98	44,78	44,83	44,73	44,75	44,72	30,99	35,64	35,65	30,84
9	50,87	49,96	50,57	51,53	50,71	50,73	56,37	48,85	49,82	57,17
10	36,78	36,38	42,4	36,37	36,00	43,12	36,60	36,51	36,87	36,79
11	32,56	32,61	32,34	32,71	32,52	32,31	30,37	29,91	29,67	30,15
12	155,4	154,9	154,8	155,4	155,26	154,43	150,33	146,22	147,06	151,01
13	132,12	132,3	132,3	132,1	132,30	132,47	46,45	55,31	55,38	46,63
14	200,8	199,8	199,6	200,7	200,60	199,28	40,43	75,50	75,90	40,73
15	130,4	130,1	130,0	130,3	130,30	130,02	141,20	136,94	137,22	141,39
16	119,5	119,9	120,0	119,6	119,74	120,12	114,56	116,58	116,26	114,36
17	22,30	22,30	23,26	22,32	22,32	22,33	109,13	113,83	113,21	108,71
18	33,53	25,90	33,35	33,74	28,24	29,17	25,93	25,94	33,55	28,25
19	21,93	21,99	22,34	24,41	15,67	16,60	21,90	21,99	21,91	15,61
20	14,38	13,99	14,91	16,73	14,38	14,85	13,75	13,66	13,98	14,11